Tento text slúži výlučne ako dokumentačný nástroj a nemá žiadny právny účinok. Inštitúcie Únie nenesú nijakú zodpovednosť za jeho obsah. Autentické verzie príslušných aktov vrátane ich preambúl sú tie, ktoré boli uverejnené v Úradnom vestníku Európskej únie a ktoré sú dostupné na portáli EUR-Lex. Tieto úradné znenia sú priamo dostupné prostredníctvom odkazov v tomto dokumente

►B

NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 440/2008

z 30. mája 2008,

ktorým sa ustanovujú testovacie metódy podľa nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemických látok (REACH)

(Text s významom pre EHP)

(Ú. v. EÚ L 142, 31.5.2008, s. 1)

Zmenené a doplnené:

		Úradný vestník		
		Č.	Strana	Dátum
►M1	Nariadenie Komisie (ES) č. 761/2009 z 23. júla 2009	L 220	1	24.8.2009
►M2	Nariadenie Komisie (EÚ) č. 1152/2010 z 8. decembra 2010	L 324	13	9.12.2010
►M3	Nariadenie Komisie (EÚ) č. 640/2012 zo 6. júla 2012	L 193	1	20.7.2012
►M4	Nariadenie Komisie (EÚ) č. 260/2014 z 24. januára 2014	L 81	1	19.3.2014
►M5	Nariadenie Komisie (EÚ) č. 900/2014 z 15. júla 2014	L 247	1	21.8.2014
►M6	Nariadenie Komisie (EÚ) 2016/266 zo 7. decembra 2015	L 54	1	1.3.2016
►M7	Nariadenie Komisie (EÚ) 2017/735 zo 14. februára 2017	L 112	1	28.4.2017
►M8	Nariadenie Komisie (EÚ) 2019/1390 z 31. júla 2019	L 247	1	26.9.2019

▼B

NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 440/2008

z 30. mája 2008,

ktorým sa ustanovujú testovacie metódy podľa nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemických látok (REACH)

(Text s významom pre EHP)

Článok 1

Testovacie metódy, ktoré sa majú uplatňovať na účely nariadenia (ES) č. 1907/2006, sa uvádzajú v prílohe k tomuto nariadeniu.

Článok 2

Komisia v prípade potreby preskúma testovacie metódy uvedené v tomto nariadení s cieľom nahradiť, obmedziť a zdokonaliť testovanie na stavovcoch.

Článok 3

Všetky odkazy na prílohu V k smernici 67/548/EHS sa vykladajú ako odkaz na toto nariadenie.

Článok 4

Toto nariadenie nadobúda účinnosť dňom nasledujúcim po jeho uverejnení v *Úradnom vestníku Európskej únie*.

Uplatňuje sa od 1. júna 2008.

▼B

PRÍLOHA

▼M6

Poznámka:

Pred použitím niektorej z týchto testovacích metód na testovanie viaczložkovej látky (MCS), látky neznámeho alebo premenlivého zloženia, produktu komplexnej reakcie alebo biologického materiálu (UVCB), alebo zmesi a v prípade, že sa jej použiteľnosť na testovanie MCS, UVCB alebo zmesí v príslušnej metóde neuvádza, malo by sa zvážiť, či daná metóda spĺňa stanovený regulačný účel.

Ak sa daná testovacia metóda používa na testovanie MCS, UVCB alebo zmesi, mali by byť dostupné čo najpodrobnejšie informácie o jej zložení napr. na základe chemickej identity jej zložiek, ich kvantitatívneho výskytu a príslušných vlastností zložiek.

▼B

ČASŤ A: METÓDY NA STANOVENIE FYZIKÁLNO-CHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ

OBSAH

A.1. TEPLOTA TOPENIA A TUHNUTIA

A.2. TEPLOTA VARU

A.3. RELATÍVNA HUSTOTA

A.4. TLAK PARY

A.5. POVRCHOVÉ NAPÄTIE

A.6. ROZPUSTNOSŤ VO VODE

A.8. ROZDEĽOVACÍ KOEFICIENT

A.9. TEPLOTA VZPLANUTIA

A.10. HORĽAVOSŤ (TUHÉ LÁTKY)

A.11. HORĽAVOSŤ (PLYNY)

A.12. HORĽAVOSŤ (KONTAKT S VODOU)

A.13. SAMOZÁPALNÉ VLASTNOSTI TUHÝCH LÁTOK A KVAPALÍN

A.14. VÝBUŠNÉ VLASTNOSTI

A.15. TEPLOTA SAMOVZNIETENIA (KVAPALINY A PLYNY)

A.16. RELATÍVNA TEPLOTA SAMOVZNIETENIA PRE TUHÉ LÁTKY

A.17. OXIDAČNÉ VLASTNOSTI (TUHÉ LÁTKY)

A.18. ČÍSELNÁ PRIEMERNÁ MOLEKULOVÁ HMOTNOSŤ A DISTRIBÚCIA MOLEKULOVÝCH HMOTNOSTÍ POLYMÉROV

A.19. OBSAH ZLOŽIEK S NÍZKOU MOLEKULOVOU HMOTNOSŤOU V POLYMÉROCH

A.20. ROZPÚŠŤACIE/EXTRAKTÍVNE VLASTNOSTI POLYMÉROV VO VODE

A.21. OXIDAČNÉ VLASTNOSTI (KVAPALINY)

A.22. DĹŽKOVÁ HODNOTA GEOMETRICKÉHO VYJADRENIA PRIEMERU VLÁKEN

A.23. ROZDEĽOVACÍ KOEFICIENT (1-OKTANOL/VODA): METÓDA POMALÉHO MIEŠANIA

A.24. ROZDEĽOVACIA KONŠTANTA (N-OKTANOL/VODA), METÓDA VYSOKOÚČINNEJ KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

A.25. DISOCIAČNÉ KONŠTANTY VO VODE (TITRAČNÁ METÓDA – SPEKTROFOTOMETRICKÁ METÓDA – KONDUKTOMETRICKÁ METÓDA)

▼B

A.1. TEPLOTA TOPENIA A TUHNUTIA

1. METÓDA

Opísané metódy sú upravené smernicou na vykonávanie OECD testov (1). Základné princípy sú uvedené v odkazoch (2) a (3).

1.1. ÚVOD

Na stanovenie teploty topenia látok je potrebné použiť opísané metódy, prístroje a zariadenia, a to bez akýchkoľvek obmedzení týkajúcich sa stupňa ich čistoty.

Výber metódy závisí od charakteru látky určenej na testovanie. Z toho dôvodu limitujúce faktory budú závisieť od toho, či príslušná látka môže byť rozomletá na prášok ľahko, ťažko alebo vôbec nie.

Pre niektoré látky je vhodnejšie stanovenie teploty tuhnutia, a preto boli do tejto metódy zahrnuté aj normy pre toto stanovenie.

V prípadoch, kde kvôli zvláštnym vlastnostiam látky nie je možné bez problémov merať žiadny z uvedených parametrov, môže byť vhodné stanovenie teploty kvapalného skupenstva, resp. teploty tuhnutia olejov.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Teplota topenia je definovaná ako teplota, pri ktorej sa zmena z tuhého do kvapalného skupenstva prejavuje pri atmosférickom tlaku, a táto teplota ideálne zodpovedá teplote tuhnutia.

Keďže fázová zmena mnohých látok sa uskutočňuje v určitom tepelnom rozmedzí, často sa opisuje ako rozmedzie topenia.

Prepočítavanie jednotiek (K na ^{o}C)

$t = T - 273{,}15$

t: teplota v stupňoch Celzia, stupne Celzia (^{o}C)

T: termodynamická teplota, kelvin (K)

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky nemusia byť použité vo všetkých prípadoch, ak sa skúma nová látka alebo nová látka obsiahnutá v prípravku. V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

Niektoré kalibračné látky sú uvedené v odkazoch (4).

▼B

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Stanoví sa teplota (teplotné rozmedzie) fázovej zmeny z tuhého do kvapalného skupenstva alebo z kvapalného do tuhého skupenstva. Prakticky sa počas zohrievania, resp. ochladzovania vzorky testovanej látky pri atmosférickom tlaku stanovujú teploty počiatočného štádia topenia, resp. tuhnutia, a konečného štádia topenia, resp. tuhnutia. Opísaných je päť metód, menovite kapilárna metóda, metódy tepelných blokov, stanovenia teploty tuhnutia, metódy termickej analýzy a stanovenie teploty kvapalného skupenstva, resp. teploty tuhnutia (metóda vyvinutá pre ropné oleje).

V určitých prípadoch môže byť vhodné merať namiesto teploty topenia teplotu tuhnutia.

1.4.1. **Kapilárna metóda**

1.4.1.1. *Zariadenia na stanovenie teploty topenia s kvapalinovým kúpeľom*

Malé množstvo jemne rozomletej látky sa vloží do kapilárnej rúrky a tesne sa natlačí. Rúrka sa zohrieva spolu s teplomerom a v priebehu vlastného topenia sa nárast teploty adjustuje na menej ako 1 K/min. Stanovuje sa počiatočná a konečná teplota topenia.

1.4.1.2. *Zariadenia na stanovenie teploty topenia s kovovým blokom*

Postupuje sa tak, ako je to opísané v odseku 1.4.1.1, avšak s výnimkou, že kapilárna rúrka a teplomer sú umiestnené do zahrievaného kovového bloku, pričom celý proces a hodnoty na teplomere možno sledovať otvormi v bloku.

1.4.1.3. *Fotočlánková detekcia*

Vzorka v kapilárnej rúrke sa zahrieva automaticky v kovovom valci. Dierou vo valci sa cez sledovanú látku namieri svetelný lúč na presne kalibrovaný fotoelektrický článok. Optické vlastnosti väčšiny látok sa počas topenia menia tak, že látka sa z nepriehľadnej mení na priehľadnú. Intenzita svetla dopadajúceho na fotoelektrický článok sa tak zvýši a vyšle stop signál k digitálnemu indikátoru, ktorý odčíta teplotu z platinového odporového teplomeru, ktorý je umiestnený vo vyhrievacej komore. Táto metóda nie je vhodná pre niektoré intenzívne sfarbené látky.

1.4.2. **Tepelné bloky**

1.4.2.1. *Koflerov tepelný blok*

Koflerov tepelný blok pozostáva z dvoch kusov kovu s rozdielnou tepelnou vodivosťou a s elektrickým ohrievaním, pričom samotný blok je zhotovený tak, aby teplotný gradient bol takmer lineárny po celej jeho dĺžke. Teplota Koflerovho tepelného bloku sa môže meniť v rozmedzí od 283 do 573 K. Tepelný blok je vybavený zvláštnym zariadením na čítanie teploty, ktoré je opatrené posuvným bežcom s ručičkou a tabuľkou zostavenou pre konkrétny typ žeraviacej tyče. Na stanovenie teploty topenia sa testovaná látka v tenkej vrstve nanesie na tepelný blok. V priebehu niekoľkých sekúnd sa vytvorí zreteľná deliaca čiara medzi kvapalnou a tuhou fázou. Teplota na deliacej čiare sa odčíta nastavením ručičky do takej polohy, aby spočívala priamo na čiare.

▼B

1.4.2.2. *Mikroskop na sledovanie taveniny*

Na stanovenie teploty topenia pri veľmi malých množstvách materiálu sa používajú viaceré mikroskopicky sledované horúce štádiá. V prípade väčšiny horúcich štádií sa teplota meria citlivým termočlánkom, ale niekedy sa používajú aj klasické ortuťové teplomery. Typický prístroj na mikroskopické sledovanie teploty topenia v horúcich štádiách pozostáva z vyhrievacej komory, v ktorej sa nachádza kovová platňa, na ktorú sa umiestni vzorka na podložné sklíčko. Uprostred kovovej platne je otvor, ktorý umožňuje prenikanie svetelných lúčov z osvetľovacieho zrkadielka mikroskopu. Počas používania je komora uzavretá sklenou platňou, aby sa zabránilo prístupu vzduchu do priestoru so skúmanou vzorkou.

Zahrievanie vzorky je regulované reostatom. Na veľmi presné merania na opticky anizotropných látkach možno použiť polarizované svetlo.

1.4.2.3. *Menisková metóda*

Táto metóda sa používa špeciálne pre polyamidy.

Vizuálne sa stanovuje teplota, pri ktorej dochádza k posunu menisku silikónového oleja, vloženého medzi zdroj horúceho štádia a krycie sklíčko, spočívajúce na polyamidovej testovanej vzorke.

1.4.3. **Metóda na stanovenie teploty tuhnutia**

Vzorka sa umiestni do zvláštnej skúšobnej trubice, ktorá sa potom vloží do prístroja na stanovovanie teploty tuhnutia. Počas ochladzovania sa vzorka jemne a neustále mieša a vo vhodných intervaloch sa meria teplota. Ak pri niekoľkých za sebou nasledujúcich čítaniach zostáva teplota konštantná, jej hodnota (s korektúrou odchýlky teplomera) sa zaznamená ako teplota tuhnutia.

Má sa zabrániť podchladeniu udržiavaním rovnováhy medzi tuhou a kvapalnou fázou.

1.4.4. **Tepelná (termická) analýza**

1.4.4.1. *Diferenciálna tepelná (termická) analýza (DTA)*

V rámci tohto postupu sa zaznamenáva rozdiel v teplotách medzi príslušnou testovanou látkou a referenčným materiálom ako funkcia teploty, pričom testovaná látka aj referenčný materiál sú vystavené tomu istému regulovanému a kontrolovanému tepelnému programu. Keď testovaná vzorka podstúpi fázovú zmenu majúcu za následok zmenu entalpic, táto zmena sa prejaví ako endotermická (topenie) alebo exotermická (tuhnutie) odchýlka od základnej čiary zaznamenávajúcej teplotu.

▼B

1.4.4.2. *Diferenciálna snímacia kalorimetria (DSK)*

V rámci tohto postupu sa zaznamenáva rozdiel v energetických vstupoch do príslušnej testovanej látky a do referenčného materiálu, pričom testovaná látka aj referenčný materiál sú vystavené tomu istému regulovanému a kontrolovanému tepelnému programu. Toto je energia, ktorá je potrebná na vytvorenie nulového teplotného rozdielu medzi testovanou látkou a referenčným materiálom. Keď testovaná vzorka podstúpi fázovú zmenu majúcu za následok zmenu entalpie, táto zmena sa prejaví ako endotermická (topenie) alebo exotermická (tuhnutie) odchýlka od základnej čiary zaznamenávajúcej tepelný tok.

1.4.5. **Teplota tuhnutia olejov**

Táto metóda bola vyvinutá na použitie s ropnými olejmi a je vhodná na použitie s olejovitými látkami vyznačujúcimi sa nízkymi teplotami topenia.

Po predchádzajúcom zohriatí sa vzorka ochladzuje špecifickou rýchlosťou a v intervaloch poklesu teploty o 3 K sa skúma jej tekutosť. Najnižšia teplota, pri ktorej sa ešte dá pozorovať pohyb testovanej látky, sa zaznamená ako teplota tuhnutia oleja.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Použiteľnosť a presnosť rozličných metód používaných na stanovenie teploty topenia, resp. rozmedzia topenia je uvedená v nasledujúcej tabuľke:

TABUĽKA: POUŽITEĽNOSŤ METÓD

A. **Kapilárne metódy**

Metóda merania	Látky, ktoré možno rozomlieť na prášok	Látky, ktoré nemožno ľahko rozomlieť na prášok	Rozsah teplôt	Odhadnutá presnosť [1]	Platná norma
Zariadenie na stanovenie teploty topenia kvapalinovým kúpeľom	áno	len pre niekoľko látok	273 až 573 K	+ 0,3 K	JIS K 0064
Zariadenie na stanovenie teploty topenia s kovovým blokom	áno	len pre niekoľko látok	293 až > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Detekcia fotočlánkom	áno	pre niektoré látky s použitím prídavných zariadení	253 až 573 K	± 0,5 K	

[1] Závisí od typu zariadenia a stupňa čistoty látky.

▼B

B. **Vyhrievacie bloky a metódy tuhnutia**

Metóda merania	Látky, ktoré možno rozomlieť na prášok	Látky, ktoré nemožno ľahko rozomlieť na prášok	Rozsah teplôt	Odhadnutá presnosť (1)	Platná norma
Koflerov vyhrievací stolík	áno	nie	283 až > 573 K	± 1 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Taviaci mikroskop	áno	len pre niekoľko látok	273 až > 5 73 K	± 0,5 K	DIN 53736
Menisková metóda	nie	predovšetkým pre polyamidy	293 až > 573 K	± 0,5 K	ISO I2I8 (E)
Metóda stanovenia teploty tuhnutia	áno	áno	223 až 573 K	± 0,5 K	napr. BS 4695

(1) Závisí od typu zariadenia a stupňa čistoty látky.

C. **Tepelná (termická) analýza**

Metóda merania	Látky, ktoré možno rozomlieť na prášok	Látky, ktoré nemožno ľahko rozomlieť na prášok	Rozsah teplôt	Odhadnutá presnosť (1)	Platná norma
Diferenčná tepelná analýza	áno	áno	173 až 1 273 K	do 600 K ± 0,5 K do 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Diferenčná skenovacia kalorimetria	áno	áno	173 až 1 273 K	do 600 K ± 0,5 K do 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Závisí od typu zariadenia a stupňa čistoty látky.

D. **Teplota tuhnutia olejov**

Metóda merania	Látky, ktoré možno rozomlieť na prášok	Látky, ktoré nemožno ľahko rozomlieť na prášok	Rozsah teplôt	Odhadnutá presnosť (1)	Platná norma
Teplota tuhnutia olejov	pre minerálne oleje a olejovité látky	pre minerálne oleje a olejovité látky	223 až 323 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66

(1) Závisí od typu zariadenia a stupňa čistoty látky.

1.6. OPIS METÓD

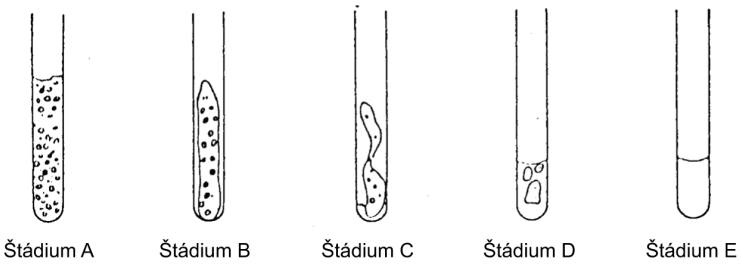
Postupy skoro všetkých skúšobných metód sú opísané v medzinárodných a štátnych normách (pozri dodatok 1).

1.6.1. **Metódy s kapilárnou rúrkou**

Keď sú testované látky, ktoré sú rozdrvené na jemný prach, vystavené pomalému nárastu teploty, zvyčajne prejavujú štádiá topenia, ktoré sú znázornené na obrázku 1.

▼B

Obrázok 1



Štádium A (začiatok procesu topenia): Jemné kvapôčky rovnomerne priliehajú k vnútornej stene kapilárnej rúrky.

Štádium B Medzi testovanou vzorkou a vnútornou stenou kapilárnej rúrky sa objavuje voľný priestor následkom zmrašťovania taveniny.

Štádium C Zmraštená testovaná vzorka sa začína zosúvať nadol a skvapalnieva.

Štádium D Na povrchu sa vytvára úplný meniskus, avšak značné množstvo testovanej vzorky zostáva naďalej v tuhom skupenstve.

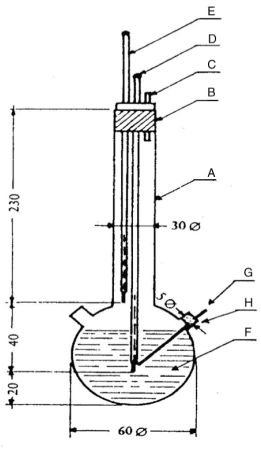
Štádium E (konečné štádium procesu topenia): V kapilárnej rúrke už nemožno sledovať žiadne tuhé čiastočky.

Počas stanovovania teploty topenia sa teploty zaznamenávajú na začiatku procesu topenia a v konečnom štádiu.

1.6.1.1. *Zariadenia na stanovenie teploty topenia s kvapalinovým kúpeľom*

Na obrázku 2 je znázornený typ štandardizovaného prístroja na meranie teploty topenia vyrobeného zo skla (JIS K 0064); všetky špecifikácie (rozmery) sú uvedené v milimetroch (mm).

Obrázok 2



A: Meracia nádoba
B: Zátka
C: Ventil
D: Teplomer
E: Prídavný teplomer
F: Kúpeľová kvapalina
G: Kapilárna rúrka vyrobená zo skla o dĺžke 80 – 100 mm, s vnútorným priemerom približne 1 mm, s maximálnym vonkajším priemerom 5 mm a s hrúbkou steny 0,2 – 0,3 mm
H: Bočná rúrka

▼B

Temperačná kvapalina:

Je potrebné zvoliť vhodnú kvapalinu. Voľba správnej kvapaliny závisí od teploty topenia, ktorá má byť stanovená, napr. parafínový olej pre teploty topenia, ktoré nepresahujú 473 K, silikónový olej pre teploty topenia, ktoré nepresahujú 573 K.

Pre teploty topenia nad 523 K sa môže použiť zmes pozostávajúca z troch dielov kyseliny sírovej a dvoch dielov síranu draselného (v pomere hmôt). Pri použití takejto zmesi je potrebné dodržiavať vhodné bezpečnostné opatrenia.

Teplomer:

Treba používať len také teplomery, ktoré spĺňajú požiadavky týchto alebo ekvivalentných noriem:

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

Postup:

Suchá testovaná látka sa v trecej miske rozomelie na jemný prášok a vloží sa do kapilárnej rúrky, ktorá je na jednom konci zatavená. Testovaný prášok sa tesne natlačí tak, aby náplň tvorila približne 3 mm stĺpec. Na účely dosiahnutia rovnomerne natesnanej vzorky je potrebné kapilárnu rúrku pustiť z výšky približne 700 mm cez sklenú rúrku vertikálne na hodinkové sklíčko.

Naplnená kapilárna rúrka sa umiestni do kúpeľa tak, aby sa stredná časť ortuťovej guľôčky teplomeru dotýkala tej časti rúrky, v ktorej je umiestnená testovaná vzorka. Kapilárna rúrka sa do prístroja vkladá zvyčajne pri teplote, ktorá je o 10 K nižšia ako samotná teplota topenia.

Temperačná kvapalina sa zahrieva tak, aby nárast teploty predstavoval približne 3 K za minútu. Kvapalinu je potrebné neustále miešať. Pri teplote približne o 10 K nižšej ako predpokladaná teplota topenia testovanej látky sa nárast teploty nastaví na maximálne 1 K za minútu.

Výpočet:

Výpočet teploty topenia je takýto:

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

kde:

T = korigovaná teplota topenia v K

T_D = teplota odčítaná na teplomere D v K

T_E = teplota odčítaná na teplomere E v K

n = počet dielikov ortuťového stĺpca teplomeru D na výstupnej trubičke.

1.6.1.2. *Zariadenia na meranie teploty topenia s kovovým blokom*

Prístroje:

Pozostávajú z týchto častí:

— valcovitý blok, ktorého horná časť je dutá a vytvára komoru (pozri obrázok 3),

— kovový vrchnák s dvoma alebo viacerými otvormi umožňujúcimi zasunutie rúrok do kovového bloku,

▼B

— ohrevný systém kovového bloku, pozostávajúci napríklad z elektrického odporu zabudovaného do kovového bloku,

— reostat na reguláciu príkonu energie v prípade použitia elektrického ohrievania,

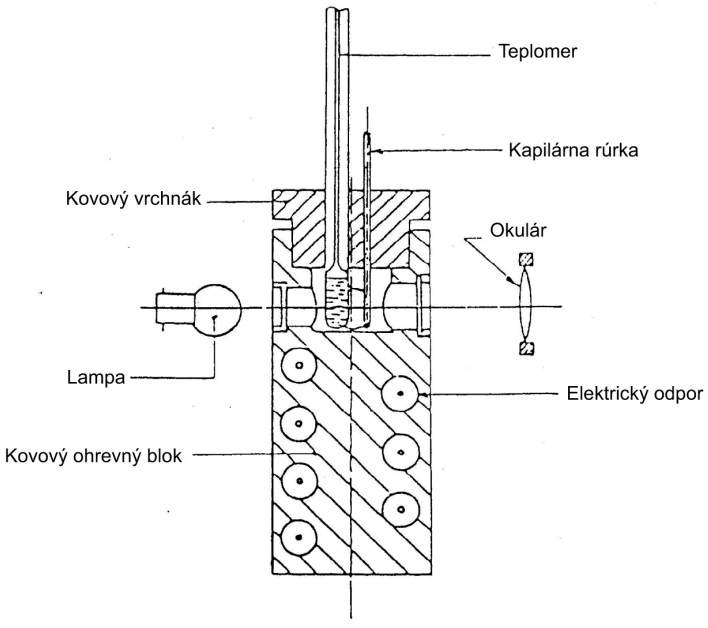
— štyri okienka zo žiaruvzdorného skla na bočných stenách komory, ktoré sú umiestnené protiľahlo a vzájomne v pravých uhloch. Pred jedným z týchto okienok je namontovaný okulár na sledovanie kapilárnej rúrky. Zvyšné tri okienka sa používajú na osvetlenie vnútornej komory kovového bloku pomocou lámp,

— kapilárna rúrka zo žiaruvzdorného skla, na jednom konci uzavretá (pozri odsek 1.6.1.1).

Teplomer:

Pozri normy spomínané v odseku 1.6.1.1. Možno tiež použiť termoelektrické meracie zariadenia s porovnateľným stupňom presnosti.

Obrázok 3



1.6.1.3. *Fotočlánková (fotónková) detekcia*

Prístroje a postup:

Prístroj pozostáva z kovovej komory s automatickým ohrevným systémom. Tri kapilárne rúrky sa naplnia testovanou látkou podľa pokynov uvedených v odseku 1.6.1.1 a umiestnia sa do piecky.

▼B

Na účely kalibrovania prístroja existuje viacero lineárnych prírastkov teploty a vhodný nárast teploty je elektricky nastavovaný predvolenou konštantnou a lineárnou rýchlosťou ohrevu. Registračné prístroje ukazujú skutočnú teplotu v piecke, ako aj teplotu testovanej látky umiestnenej v kapilárnych rúrkach.

1.6.2. **Tepelné bloky**

1.6.2.1. *Koflerov tepelný blok*

Pozri dodatok.

1.6.2.2. *Mikroskop na sledovanie taveniny*

Pozri dodatok.

1.6.2.3. *Menisková metóda (polyamidy)*

Pozri dodatok.

Rýchlosť ohrevu pri teplote topenia by mala byť nižšia ako 1 K za minútu.

1.6.3. **Metódy na stanovenie teploty tuhnutia**

Pozri dodatok.

1.6.4. **Tepelná analýza**

1.6.4.1. *Diferenciálna tepelná analýza*

Pozri dodatok.

1.6.4.2. *Diferenciálna snímacia kalorimetria*

Pozri dodatok.

1.6.5. **Stanovenie teploty tuhnutia olejov**

Pozri dodatok.

2. **ÚDAJE**

V niektorých prípadoch je potrebná korekcia teplomeru.

3. **SPRÁVA**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

— použitú metódu,

— presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímesi) a opatrenia v rámci predbežnej purifikácie testovanej látky, ak boli takéto uskutočnené,

— stanovenie presnosti.

Ako teplota topenia sa v správe uvádza priemer najmenej dvoch meraní, ktoré sa nachádzajú v rozmedzí stanovenej presnosti (pozri tabuľky).

▼B

Ak sa rozdiel medzi teplotou na začiatku a v konečnom štádiu procesu topenia nachádza v rámci hraničných limitov presnosti metódy, za teplotu topenia sa bude považovať teplota nameraná v konečnom štádiu procesu topenia. Inak sa v správe uvádzajú obidve teploty.

Ak sa testovaná látka rozloží alebo sublimuje ešte pred dosiahnutím teploty topenia, v správe je potrebné uviesť teplotu, pri ktorej bol tento jav pozorovaný.

V správe musia byť uvedené všetky informácie a poznámky, ktoré sú dôležité pre interpretáciu výsledkov testu, najmä týkajúce sa prímesí a fyzikálneho stavu testovanej látky.

4. **ODKAZY**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline No 102, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. (vyd.). Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, vol. II, 803 – 834.

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

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

▼B

Dodatok

V prípade potreby dodatočných technických podrobností možno použiť napríklad tieto technické normy:

1. **Kapilárne metódy**

1.1. Zariadenia na stanovenie teploty topenia s kvapalným kúpeľom

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

1.2. Zariadenia na stanovenie teploty topenia s kovovým blokom

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

2. **Tepelné bloky**

2.1. Koflerov tepelný blok

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

2.2. Mikroskop na sledovanie tavenín

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen.

2.3. Menisková metóda (polyamidy)

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 ménisque

3. **Metódy na stanovenie teploty tuhnutia**

BS 463 3	Method for the determination of crystallizing point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207	Cires de pétrole: détermination de la température de figeage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. **Tepelná analýza**

4.1. Diferenciálna tepelná analýza

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. Diferenciálna snímacia kalorimetria

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. **Stanovenie teploty tuhnutia olejov**

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

▼B

A.2. TEPLOTA VARU

1. METÓDA

Opísané metódy sú upravené smernicou na vykonávanie OECD testov (1). Základné princípy sú uvedené v odkazoch (2) a (3).

1.1. ÚVOD

Metódy, prístroje a zariadenia opísané v tejto časti môžu byť použité pre kvapalné látky a látky s nízkou teplotou topenia za predpokladu, že tieto látky nepodliehajú reakciám pod teplotou varu (napr. samovoľnej oxidácii alebo prešmykovaniu či degradácii a pod.). Metódy môžu byť aplikované na čisté, ako aj na nečisté kvapalné látky.

Dôraz sa kladie na metódy využívajúce fotočlánkovú detekciu a tepelnú (termickú) analýzu, pretože tieto metódy umožňujú stanovenie teploty topenia a zároveň aj teploty varu. Navyše, merania sa môžu uskutočniť automaticky.

Tzv. „dynamická metóda“ má tú výhodu, že sa môže použiť aj na stanovenie tlaku pary a nie je teda potrebné upravovať teplotu varu k normálnemu tlaku (101,325 kPa), pretože normálny tlak sa môže počas meraní upravovať manostatom.

Poznámky:

Vplyv prímesí na stanovenie teploty varu závisí vo veľkej miere od charakteru prímesi. Keď sa vo vzorke nachádzajú prchavé prímesi, ktoré by mohli nepriaznivo ovplyvniť výsledky, testovaná látka sa očistí.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Normálna teplota varu je definovaná ako teplota, pri ktorej má tlak pary danej kvapaliny hodnotu 101,325 kPa.

Ak sa teplota varu nemeria pri normálnom atmosférickom tlaku, závislosť teploty od tlaku pary môže byť opísaná Clausiusovou-Clapeyronovou rovnicou:

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

kde:

P = tlak pary testovanej látky v pascaloch

ΔH_v = jej výparné teplo (skupenské teplo vyparovania) v J mol^{-1}

R = univerzálna mólová plynová konštanta = 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = termodynamická teplota v K

Teplota varuje stanovená pri zohľadnení okolitého tlaku pôsobiaceho počas merania.

▼B

Prepočty

Tlak (jednotky: kPa)

100kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(„bar“ je naďalej prípustná jednotka, avšak neodporúča sa jej používanie)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(jednotky „mm Hg“ a „Torr“ nie sú prípustné)

1 atm = štandardná atmosféra = 101 325 Pa

(jednotka „atm“ nie je prípustná).

Teplota (jednotky K – kelvin)

$t = T - 273,15$

t: teplota v stupňoch Celzia, stupne Celzia (^{o}C),

T: termodynamická teplota, kelvin (K).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky nemusia byť použité vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová látka alebo nová látka obsiahnutá v prípravku. V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

Niektoré kalibračné látky možno vyhľadať v metódach uvedených v dodatku.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Päť metód na stanovenie teploty varu (rozmedzia varu) sa zakladá na meraní teploty varu, dve ďalšie sa zakladajú na tepelnej analýze.

1.4.1. **Stanovenie použitím ebuliometra**

Ebuliometre boli pôvodne vyvinuté na stanovenie hmotnosti molekúl zvýšením teploty varu, ale sú vhodné aj na presné merania teploty varu. Veľmi jednoduchý prístroj je opísaný v technickej norme ASTM D 1120-72 (pozri dodatok). Kvapalina sa v tomto prístroji zohrieva v rovnovážnych podmienkach pri atmosférickom tlaku až po dosiahnutie varu.

1.4.2. **Dynamická metóda**

Táto metóda spočíva v meraní rekondenzačnej teploty pary v spätnom toku počas varu pomocou vhodného teplomeru. Pri tejto metóde môže byť regulovaný tlak.

1.4.3. **Destilačná metóda pre teplotu varu**

Táto metóda spočíva v destilácii kvapaliny a v meraní rekondenzačnej teploty pary a v stanovení množstva destilátu.

▼B

1.4.4. **Metóda podľa Siwoloboffa**

Testovaná vzorka sa zahrieva vo vzorkovej rúrke, ktorá je ponorená do kvapaliny v tepelnom kúpeli. Do vzorkovej rúrky sa zasunie zatavená kapilára, ktorá obsahuje vo svojej spodnej časti vzduchovú bublinu.

1.4.5. **Fotočlánková detekcia**

Postupuje sa podľa princípov Siwoloboffovej metódy, avšak s uskutočnením automatického fotoelektrického merania pri použití stúpajúcich bublín.

1.4.6. **Diferenciálna tepelná analýza**

Touto technikou merania sa zaznamenáva teplotný rozdiel medzi testovanou látkou a referenčným materiálom ako funkcia teploty, pričom testovaná látka aj referenčný materiál sú vystavené tomu istému regulovanému a kontrolovanému teplotnému programu. Keď testovaná vzorka prejde fázovou zmenou zahrnujúcou zmenu entalpie, táto zmena sa prejaví endotermickou odchýlkou (varom) od základnej línie teplotného záznamu.

1.4.7. **Diferenciálna snímacia kalorimetria**

Touto meracou technikou sa zaznamenáva rozdiel vo vstupoch energie do testovanej látky a do referenčného materiálu ako funkcia teploty, pričom testovaná látka aj referenčný materiál sú vystavené tomu istému regulovanému a kontrolovanému teplotnému programu. Toto je energia, ktorá je potrebná na vytvorenie nulového teplotného rozdielu medzi testovanou látkou a referenčným materiálom. Keď testovaná vzorka prejde fázovou zmenou zahrnujúcou zmenu entalpie, táto zmena sa prejaví endotermickou odchýlkou (varom) od základnej línie záznamu tepelného toku.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Aplikovateľnosť a presnosť rozdielnych metód použitých na stanovenie teploty varu, resp. teplotného rozmedzia, je uvedená v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Porovnanie metód

Metóda merania	Odhadnutá presnosť	Platná norma
Stanovenie ebuliometrom	± 1,4 K (do 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (do 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Dynamická metóda	± 0,5 K (do 600 K) (2)	
Destilačná metóda (stanovenie rozmedzia teploty varu)	± 0,5 K (do 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Postup podľa Siwoloboffa	± 2 K (do 600 K) (2)	
Detekcia fotočlánkom	± 0,3 K (do 373 K) (2)	
Diferenčná tepelná analýza	± 0,5 K (do 600 K) ± 2,0 K (do 1 273 K)	ASTM E 537-76
Diferenčná snímacia kalorimetria	± 0,5 K (do 600 K) ± 2,0 K(do 1 273K)	ASTM E 537-76

(1) Táto presnosť platí len pre jednoduchý prístroj opísaný napr. v norme ASTM D 1120-72; môže byť zlepšená použitím dokonalejšieho ebuliometra.

(2) Platí len pre čisté látky. Použitie za iných okolností by malo byť zdôvodnené.

▼B

1.6. OPIS SKÚŠOBNÝCH METÓD

Postupy niektorých skúšobných metód sú opísané v medzinárodných a štátnych technických normách (pozri dodatok).

1.6.1. **Ebuliometer**

Pozri dodatok.

1.6.2. **Dynamická metóda**

Pozri testovaciu metódu A.4 na stanovenie tlaku pary.

Zaznamenáva sa teplota varu pozorovaná pri aplikovanom tlaku 101,325 kPa.

1.6.3. **Destilačný proces (rozmedzie varu)**

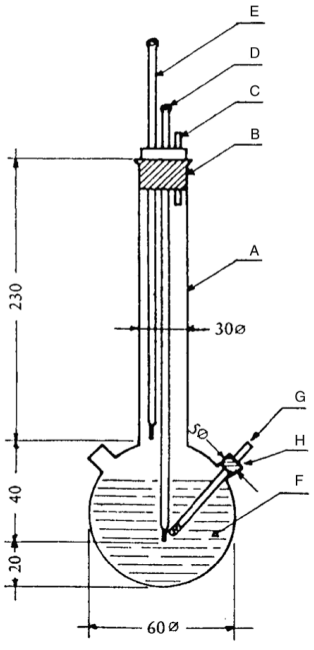
Pozri dodatok.

1.6.4. **Metóda podľa Siwoloboffa**

Testovaná vzorka sa zahrieva v prístroji na meranie teploty topenia vo vzorkovej rúrke s priemerom približne 5 mm (obrázok 1).

Obrázok 1 znázorňuje typ štandardizovaného prístroja na meranie teploty topenia a teploty varu (podľa technickej normy JIS K 0064) (vyrobený zo skla, všetky rozmery sú uvedené v milimetroch).

Obrázok 1



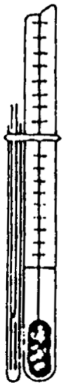
A: Meracia náboda
B: Zátka
C: Ventil
D: Teplomer
E: Prídavný teplomer
F: Kúpeľová kvapalina
G: Kapilárna rúrka vyrobená zo skla o dĺžke 80 – 100 mm, s vnútorným priemerom približne 1 mm, s maximálnym vonkajším priemerom 5 mm a s hrúbkou steny 0,2 – 0,3 mm
H: Bočná rúrka

Kapilárna rúrka (varná kapilára), ktorá je zatavená približne vo výške 1 cm nad spodným koncom, sa umiestni do vzorkovej rúrky. Výška úrovne, do ktorej sa pridá testovaná látka, musí byť taká, aby zatavená časť kapiláry bola pod hladinou kvapaliny. Vzorková rúrka obsahujúca varnú kapiláru sa buď pripevní k teplomeru pomocou gumičky, alebo sa zboku fixuje podpierkou (pozri obrázok 2).

▼B

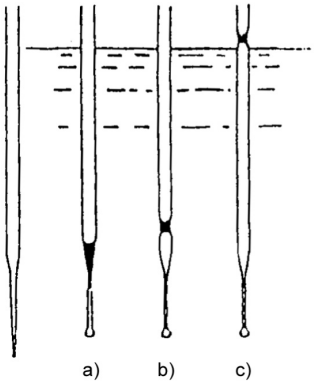
Obrázok 2

Princíp podľa Siwoloboffa



Obrázok 3

Modifikovaný princíp



Temperačná kvapalina sa zvolí v závislosti od teploty varu. Pri teplotách do 573 K možno použiť silikónový olej. Parafínový olej možno použiť len do teploty 473 K. Zahrievanie temperačnej kvapaliny musí byť spočiatku adjustované na nárast teploty 3 K za minútu. Temperačná kvapalina sa musí neustále miešať. Pri teplote približne 10 K pod predpokladanou teplotou varu sa intenzita zahrievania zníži na menej ako 1 K za minútu. V bezprostrednej blízkosti teploty varu sa vo varnej kapiláre začnú rýchlo tvoriť bublinky.

Teplota varu je tá teplota, keď pri momentálnom ochladení v kapiláre ustane tvorba reťazca bubliniek a zrazu začne stúpať stĺpec kvapaliny. Zodpovedajúci údaj na stupnici teplomeru bude predstavovať teplotu varu príslušnej testovanej látky.

V prípade modifikovaného princípu (obrázok 3) sa teplota varu stanovuje v kapiláre na meranie teploty topenia. Koniec kapiláry sa nataví a natiahne do hrotu v dĺžke asi 2 cm (a) a nasaje sa malé množstvo testovanej látky. Otvorený koniec jemnej kapiláry sa uzavrie zatavením tak, že na konci zostane malá vzduchová bublinka. Počas zohrievania v prístroji na stanovenie teploty topenia (b) sa vzduchová bublinka rozpína. Teplota varu zodpovedá teplote, pri ktorej testovaná látka dosiahne povrch temperačnej kvapaliny (c).

1.6.5. **Fotočlánková detekcia**

Testovaná vzorka sa zahrieva v kapiláre umiestnenej vo vyhrievanom kovovom bloku.

Cez vhodne umiestnené otvory v kovovom bloku sa nasmeruje svetelný lúč cez testovanú látku na dôkladne kalibrovaný fotočlánok.

Počas nárastu teploty testovanej vzorky sa vo varnej kapiláre začnú objavovať samostatné vzduchové bublinky. Keď sa dosiahne teplota varu, počet vzduchových bubliniek sa nápadne zvýši. Tento jav spôsobí zmenu v intenzite svetla zaznamenanú fotočlánkom, ktorý vyšle stop signál indikátoru odčítavajúcemu teplotu z platinového odporového teplomeru umiestneného v kovovom bloku.

Táto metóda je obzvlášť výhodná, pretože umožňuje stanovenie skúmaných hodnôt aj pri teplotách nižších ako bežná izbová teplota až do 253,15 K (–20 °C) bez akýchkoľvek zmien na prístroji. Inštrument stačí iba umiestniť do chladiaceho kúpeľa.

▼B

1.6.6. **Tepelná analýza**

1.6.6.1. *Diferenciálna tepelná analýza*

Pozri dodatok.

1.6.6.2. *Diferenciálna snímacia kalorimetria*

Pozri dodatok.

2. **ÚDAJE**

Pri malých odchýlkach od normálneho tlaku (max. ± 5 kPa) sa teploty varu normalizujú na T_n pomocou tejto rovnice podľa Sidneyho Younga:

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

kde:

$\Delta p = (101{,}325 - p)$ [pozor na znamienko!]

P = meranie tlaku v kPa

f_T = pomer zmeny teploty varu k tlaku v K/kPa

T = nameraná teplota varu v K

T_n = teplota varu korigovaná k normálnemu tlaku v K

Opravné koeficienty na teplotu, f_T, a rovnice na ich aproximáciu sú pre mnohé látky zahrnuté v uvedených medzinárodných a národných technických normách.

Napríklad v metóde podľa technickej normy DIN 53171 sa spomínajú tieto hrubé opravy pre rozpúšťadlá obsiahnuté v náterových farbách:

Tabuľka 2

Opravné koeficienty f_T na teplotu

Teplota T (K)	Opravný koeficient 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. **SPRÁVA**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

— použitú metódu,

— presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a nečistoty) a opatrenia v rámci predbežnej purifikácie testovanej látky, ak boli takéto uskutočnené,

— odhad presnosti.

Ako teplota varu sa uvádza stredná hodnota najmenej dvoch meraní, ktoré sú v rozmedzí stanovenej presnosti (pozri tabuľku 1).

V správe musia byť zaznamenané namerané teploty varu a ich priemerné hodnoty a tlak, resp. tlaky, pri ktorých boli merania uskutočnené a sú uvedené v kPa. Odporúča sa, aby použitý tlak dosahoval hodnoty blížiace sa normálnemu atmosférickému tlaku.

V správe musia byť uvedené všetky informácie a poznámky, ktoré sú dôležité pre interpretáciu výsledkov testu, najmä týkajúce sa prímesí a fyzikálneho skupenstva (stavu) testovanej látky.

4. **ODKAZY**

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

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

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

▼B

Dodatok

V prípade potreby dodatočných technických podrobností možno použiť napríklad tieto technické normy:

1. **Ebuliometer**

1.1. Zariadenia na stanovenie teploty topenia s kvapalným kúpeľom

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

2. **Destilačný proces (rozmedzie varu)**

ISO/R 918	Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/7 1	Method for the determination of distillation characteristics
DIN 53171	Losungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **Diferenciálna tepelná analýza a diferenciálna snímacia kalorimetria**

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. RELATÍVNA HUSTOTA

1. METÓDA

Opísané metódy sú upravené smernicou na vykonávanie OECD testov (1). Základné princípy sú uvedené v odkaze (2).

1.1. ÚVOD

Opísané metódy na stanovenie relatívnej hustoty sa môžu použiť pre tuhé a kvapalné látky bez akýchkoľvek obmedzení v spojitosti so stupňom ich čistoty. Rozličné použiteľné metódy sú uvedené v tabuľke 1.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Relatívna hustota, D^{20}_4, tuhých látok alebo kvapalín je pomer medzi hmotnosťou objemu príslušnej látky určenej na testovanie, stanovenou pri teplote 20 °C, a hmotnosťou toho istého objemu vody, stanovenou pri teplote 4 °C. Relatívna hustota nemá žiadny rozmer.

Hustota, P, danej látky je pomer hmotnosti, m, a jej objemu, v.

Hustota, P, sa udáva v jednotkách SI, v kg/m^3.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY (1) (3)

Referenčné látky sa nemusia použiť vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová chemická látka alebo nová chemická látka obsiahnutá v chemickom prípravku. V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNÝCH METÓD

Používajú sa štyri triedy (skupiny) skúšobných metód.

1.4.1. **Výtlačné metódy**

1.4.1.1. *Hustomer* (pre kvapalné látky)

Dostatočne presné a rýchle stanovenia hustoty možno dosiahnuť ponorným hustomerom, ktorý umožňuje stanovenie hustoty testovanej kvapaliny na základe hĺbky ponorenia odčítaním príslušnej hodnoty z delenej stupnice.

1.4.1.2. *Hydrostatické váhy* (pre tuhé a kvapalné látky)

Na stanovenie hustoty možno použiť rozdiel medzi hmotnosťou príslušnej testovanej vzorky, meranou vo vzduchu a vo vhodnej kvapaline (napr. vo vode).

V prípade tuhých látok sa nameraná hustota vzťahuje iba na konkrétnu použitú vzorku. Na stanovenie hustoty kvapalín sa teleso so známym objemom, v, odváži najprv vo vzduchu a potom v kvapaline.

1.4.1.3. *Metóda ponoreného telesa* (pre kvapalné látky) (4)

V rámci tejto metódy sa hustota kvapaliny stanoví z rozdielu hodnôt váženia kvapaliny pred ponorením a po ponorení telesa so známym objemom do testovanej kvapaliny.

▼B

1.4.2. **Pyknometrické metódy**

Pre tuhé alebo kvapalné látky možno použiť pyknometre rozličných tvarov a so známymi objemami. Hustota sa vypočíta z rozdielu hmotnosti medzi plným a prázdnym pyknometrom a jeho známeho objemu.

1.4.3. **Vzduchový porovnávací pyknometer** (pre tuhé látky)

Hustota tuhej látky v akejkoľvek forme sa môže merať pri teplote miestnosti pomocou plynového porovnávacieho pyknometra. Objem látky sa meria vo vzduchu alebo v inertnom plyne vo valci s meniteľným kalibrovaným objemom. Na výpočet hustoty sa jedno meranie hmotnosti vykoná po ukončení merania objemu.

1.4.4. **Oscilujúci hustomer** (5) (6) (7)

Hustota kvapaliny sa môže merať aj oscilujúcim hustomerom. Mechanický oscilátor zostrojený v tvare trubice do U sa rozkmitá na rezonančný kmitočet oscilátora, ktorý závisí od jeho hmotnosti. Vloženie testovanej látky zmení rezonančný kmitočet oscilátora. Prístroj musí byť kalibrovaný dvoma kvapalnými látkami známej hustoty. Tieto látky by sa mali zvoliť podľa možnosti tak, aby ich hustoty pokryli celý meraný rozsah.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Použiteľnosť rozdielnych metód používaných na stanovenie relatívnej hustoty je uvedená v tabuľke.

1.6. OPIS METÓD

Technické normy uvedené ako príklady, ktoré treba použiť pre dodatočné technické podrobnosti, sú uvedené v dodatku.

Testy sa musia vykonať pri teplote 20 °C, a zároveň je potrebné uskutočniť vždy aspoň dve merania.

2. **ÚDAJE**

Pozrite príslušné technické normy uvedené v dodatku.

3. **SPRÁVA**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

— použitú metódu,

— presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímesi) a opatrenia v rámci predbežnej purifikácie testovanej látky, ak sa takéto uskutočnili.

Relatívna hustota, D_4^{20}, musí byť v správe uvedená podľa definície v bode 1.2, spolu s fyzikálnym stavom meranej látky.

Musia byť uvedené všetky informácie a poznámky, ktoré sú dôležité pre interpretáciu výsledkov, obzvlášť v súvislosti s prímesami a s fyzikálnym skupenstvom testovanej látky.

▼B

Tabuľka

Použiteľnosť metód

Metóda merania	Hustota		Najvyššia možná hodnota dynamickej viskozity	Platná norma
	tuhé látky	kvapaliny		
1.4.1.1. Hustomer		áno	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Hydrostatické váhy				
a) tuhé látky	áno			ISO 1183 (A),
b) kvapaliny		áno	5 Pa s	ISO 901 a 758
1.4.1.3. Metóda ponoreného telesa		áno	22 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Pyknometer				ISO 3507
a) tuhé látky	áno			ISO 1183 (B), NF T 20-053
b) kvapaliny		áno	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Vzduchový porovnávací pyknometer	áno			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4. Oscilujúci hustomer		áno	5 Pa s	

4. **ODKAZY**

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

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

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

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

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

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

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

▼B

Dodatok

V prípade potreby dodatočných technických podrobností možno použiť napríklad tieto technické normy:

1. **Výtlačné metódy**

1.1. Hydrometer

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 – Aerometric method
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2. Hydrostatické váhy

Pre tuhé látky

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

Pre kvapalné látky

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 and 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. Metóda ponoreného telesa

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

2. **Pyknometrické metódy**

2.1. Pre kvapalné látky

ISO 3507	Pycnometers
ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)
DIN 12798	Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than 100. 10^{-6} m^2 s^{-1} at 15 °C)
DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than 100. 10^{-6} m^2 s^{-1} at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C)

▼B

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

▼B

2.2.	Pre tuhé látky	
	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.	**Vzduchový porovnávací pyknometer**	
	DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
	DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼M1

A.4. Tlak pary

1. METÓDA

Táto metóda je rovnocenná s OECD TG 104 (2004).

1.1. ÚVOD

Táto revidovaná verzia metódy A.4(1) obsahuje dodatočnú metódu, výtokovú metódu: izotermálnu termogravimetriu určenú pre látky s veľmi nízkym tlakom (až do 10^{-10} Pa). Vzhľadom na potreby postupov, najmä pokiaľ ide o získanie tlaku pary v prípade látok s nízkym tlakom pary, sa prehodnotili iné postupy tejto metódy pri zohľadnení rozmedzí použiteľnosti.

Pri termodynamickej rovnováhe je tlak pary čistej látky výlučne funkciou teploty. Základné princípy sú uvedené v odkazoch (2) (3).

Neexistuje jediný postup merania, ktorý by sa dal aplikovať na celé rozmedzie tlakov pary od menej ako 10^{-10} Pa do 10^5 Pa. V tejto metóde sa uvádza osem metód na meranie tlaku pary, ktoré sa môžu použiť v rôznych rozmedziach tlakov pary. Porovnávajú sa rôzne metódy, pokiaľ ide o uplatnenie a rozsah merania v tabuľke 1. Metódy sa môžu použiť výlučne na zlúčeniny, ktoré sa v podmienkach testu nerozkladajú. V prípadoch, keď sa z technických dôvodov nemôžu uplatniť experimentálne metódy, možno tiež tlak pary odhadnúť a odporúčaná metóda odhadu je uvedená v dodatku.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Tlak pary látky je definovaný ako tlak nasýtenej pary nad tuhou alebo kvapalnou látkou.

Pre tlak sa používa jednotka SI pascal (Pa). Ďalej sa uvádzajú iné jednotky, ktoré sa používali v minulosti, spolu s ich prepočítavacími koeficientmi:

1 Torr = 1 mm Hg = $1{,}333 \times 10^2$ Pa

1 atmosféra = $1{,}013 \times 10^5$ Pa

1 bar = 10^5 Pa

Jednotkou teploty v rámci sústavy SI je kelvin (K). Stupne Celzia sa prepočítavajú na kelviny podľa vzorca:

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

kde T je kelvin alebo termodynamická teplota a t je teplota v stupňoch Celzia.

▼**M1**

Tabuľka 1

Metóda merania	Látky		Odhadovaná opakovateľnosť	Odhadovaná reprodukovateľnosť	Odporúčaný rozsah
	Tuhá	Kvapalná			
Dynamická metóda	s nízkou teplotou tavenia	áno	do 25 % 1 až 5 %	do 25 % 1 až 5 %	10^3 Pa až 2×10^3 Pa 2×10^3 Pa až 10^5 Pa
Statická metóda	áno	áno	5 až 10 %	5 až 10 %	10 Pa až 10^5 Pa 10^{-2} Pa až 10^5 Pa (1)
Metóda s s použitím izoteniskopu	áno	áno	5 až 10 %	5 až 10 %	10^2 Pa až 10^5 Pa
Výtoková metóda: váhy na meranie tlaku pary	áno	áno	5 až 20 %	do 50 %	10^{-3} až 1 Pa
Výtoková metóda: Knudsenova komôrka	áno	áno	10 až 30 %	—	10^{-10} až 1 Pa
Výtoková metóda: izotermálna termogravimetria	áno	áno	5 až 30 %	do 50 %	10^{-10} až 1 Pa
Metóda plynovej saturácie	áno	áno	10 až 30 %	do 50 %	10^{-10} až 10^3 Pa
Metóda rotujúcej guľôčky	áno	áno	10 až 20 %	—	10^{-4} až 0,5 Pa

(1) Pri použití kapacitného manometra.

1.3. PRINCÍP TESTU

Vo všeobecnosti sa tlak pary stanovuje pri rozličných teplotách. V limitovanom teplotnom rozmedzí je logaritmus tlaku pary čistej látky lineárnou funkciou inverzie termodynamickej teploty podľa zjednodušenej Clapeyronovej-Clausiusovej rovnice:

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

kde:

p = tlak pary látky vyjadrený v pascaloch

ΔHv = teplota vyparovania v J mol^{-1}

R = všeobecná plynová konštanta, 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = teplota v K (v kelvinoch).

▼**M1**

1.4. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky sa nemusia použiť. V prvom rade slúžia na občasnú kontrolu účinnosti metódy a na umožnenie porovnania výsledkov dosiahnutých pri použití rozličných metód.

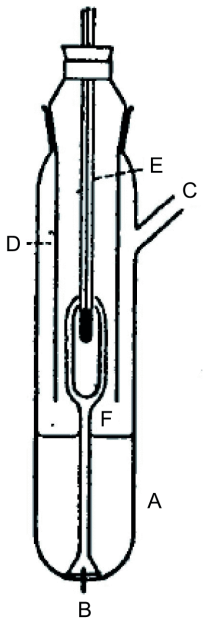
1.5. OPIS METÓDY

1.5.1. **Dynamická metóda (Cottrellova metóda)**

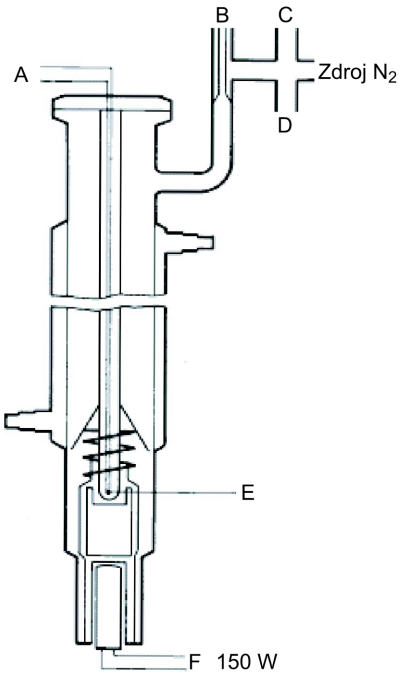
1.5.1.1. *Princíp*

Tlak pary sa meria stanovením teploty varu látky pri rôznych špecifikovaných tlakoch v rozmedzí približne 10^3 a 10^5 Pa. Táto metóda sa odporúča aj na stanovenie teploty varu. Na tento účel sa dá použiť až do teploty 600 K. Teploty varu kvapalných látok sú približne o 0,1 °C vyššie v hĺbke 3 až 4 cm ako na povrchu kvôli hydrostatickému tlaku stĺpca kvapaliny. V Cottrellovej metóde (4) sa teplomer umiestni do pary nad povrch kvapaliny a vriaca kvapalina sa kontinuálne vyzdvihne nad guľôčku teplomeru. Tenká vrstva kvapaliny, ktorá je v rovnováhe s parou pri atmosférickom tlaku, pokryje guľôčku. Teplomer takto odmeria skutočný bod varu bez chýb kvôli prehriatiu alebo hydrostatickému tlaku. Pumpa, ktorú skonštruoval Cottrell, je znázornená na obrázku 1. Trubica A obsahuje vriacu kvapalinu. Platinový drôt B zatavený do dna umožňuje rovnomerný var. Bočná trubica C vedie k chladiču a plášť D zabraňuje, aby sa studený kondenzát dostal k teplomeru E. Keď kvapalina v A vrie, bubliny a kvapalina zachytená v lieviku sa vlejú cez dve ramená pumpy F nad guľôčku teplomeru.

Obrázok 1



Obrázok 2



▼**M1**

Cottrellova pumpa (4)

A: Termočlánok

B: Objem na vyrovnávanie vákua

C: Manometer

D: Vákuum

E: Miesto merania

F: Ohrievací článok približne 150 W

1.5.1.2. *Prístroje*

Veľmi presný prístroj využívajúci Cottrellovu metódu je znázornený na obrázku 2. Pozostáva z trubice s varnou časťou v spodnej časti, chladiča v strednej časti a výstupom a prírubou v hornej časti. Cottrellova pumpa je umiestnená vo varnej časti, ktorú zohrieva elektrický patrónový ohrievač. Teplota sa meria pomocou plášťového termočlánku alebo odporového teplomera zasunutím cez prírubu na vrchu. Výstup je pripojený k zariadeniu na reguláciu tlaku. Zariadenie na reguláciu tlaku pozostáva z vákuovej pumpy, objemu na vyrovnávanie, manostatu na dávkovanie dusíka na reguláciu tlaku a manometra.

1.5.1.3. *Postup*

Látka sa umiestni do varnej časti. S problémami sa možno stretnúť v prípade tuhých látok, ktoré nie sú vo forme prášku, ale tieto problémy sa môžu v niektorých prípadoch vyriešiť zahriatím chladiaceho plášťa. Po naplnení nádoby sa prístroj tesne uzavrie v prírube a testovaná látka sa odplyní. Použitie tejto metódy nie je vhodné pre peniace látky.

Ďalej sa nastaví najnižší požadovaný tlak a zapne sa ohrievanie. Zároveň sa snímač teploty pripojí na registračný prístroj.

Rovnováha sa dosiahne vtedy, keď sa zaregistruje konštantná teplota varu pri konštantnom tlaku. Treba dávať pozor najmä na to, aby sa zabránilo prudkému varu. Okrem toho sa musí v chladiči dosiahnuť úplná kondenzácia. Keď sa stanovuje tlak pary tuhých látok s nízkou teplotou topenia, je potrebné dbať na to, aby sa zabránilo zablokovaniu chladiča.

Po zaregistrovaní tohto rovnovážneho bodu sa nastaví vyšší tlak. Postup pokračuje rovnakým spôsobom až po dosiahnutie tlaku 10^5 Pa (spolu je to približne 5 až 10 meraní). V rámci kontroly sa musia rovnovážne body opakovať a merať pri klesajúcich tlakoch.

1.5.2. **Statická metóda**

1.5.2.1. *Princíp*

V statickej metóde (5) sa pri termodynamickej rovnováhe stanovuje tlak pary pri špecifikovanej teplote. Táto metóda je vhodná pre látky a viaczložkové kvapaliny a tuhé látky v rozmedzí od 10^{-1} do 10^5 Pa a za predpokladu, že sa bude postupovať opatrne, aj v rozmedzí 1 až 10 Pa.

▼**M1**

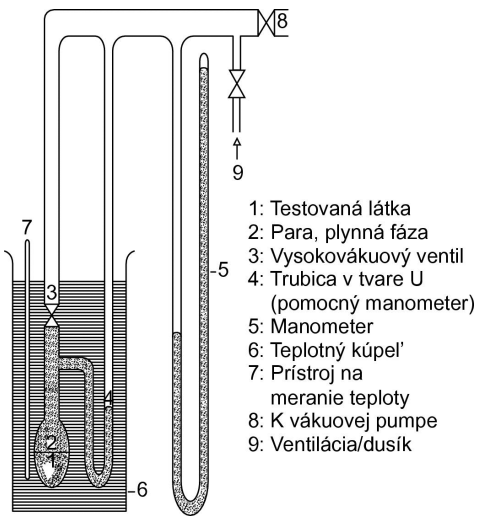
1.5.2.2. *Prístroje*

Prístroj pozostáva z kúpeľa s konštantnou teplotou (presnosť ± 0,2 K), nádoby na testovanú vzorku pripojenej k podtlakovej rúrke, manometra a systému na reguláciu tlaku. Komora na vzorky (obrázok 3a) je pripojená k podtlakovej rúrke cez ventil a diferenciálny manometer (trubica v tvare U obsahuje vhodnú manometrovú kvapalinu), ktorá slúži ako nulový indikátor. Pre diferenčný manometer možno použiť ortuť, silikóny a ftaláty v závislosti od tlakového rozmedzia a chemických vlastností testovanej látky. Pokiaľ možno, malo by sa z ekologických dôvodov vyhnúť používaniu ortuti. Testovaná látka sa nesmie vo výraznejšej miere rozpúšťať v kvapaline nachádzajúcej sa v trubici v tvare U alebo s ňou reagovať. Namiesto trubice v tvare U možno použiť manometer (obrázok 3b). Pre manometer možno v rozsahu normálneho atmosférického tlaku do 10^2 Pa použiť ortuť, zatiaľ čo silikóny a ftaláty sú vhodné na použitie pri tlakoch nižších ako 10^2 Pa až po 10 Pa. Existujú aj iné manometre, ktoré možno použiť pri tlakoch nižších ako 10^2 Pa a pri tlakoch nižších ako 10^{-1} Pa sa môžu dokonca použiť kapacitné manometre so zahrievateľnou membránou. Teplota sa meria na vonkajšej stene nádoby obsahujúcej vzorku alebo v samotnej nádobe.

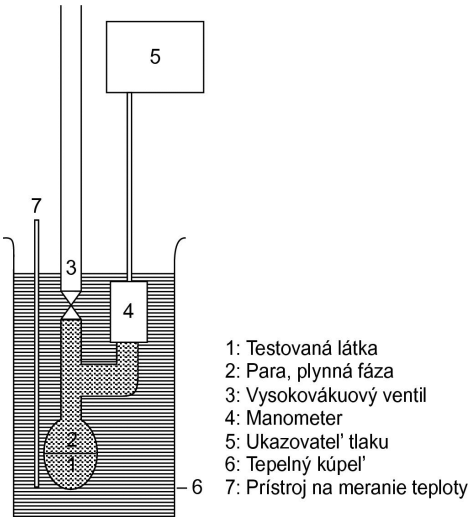
1.5.2.3. *Postup*

Ak sa použije prístroj opísaný na obrázku 3a, naplňte trubicu v tvare U zvolenou kvapalinou, ktorá musí byť pred odčítaním nameraných hodnôt odplynená pri zvýšenej teplote. Testovaná látka sa umiestni do prístroja a odplyní pri zníženej teplote. V prípade viaczložkovej vzorky by mala byť teplota dostatočne nízka, aby sa zabezpečilo, že sa nezmení zloženie materiálu. Rovnováhu možno rýchlejšie dosiahnuť miešaním. Vzorka sa môže chladiť kvapalným dusíkom alebo suchým ľadom, pričom treba dbať na to, aby sa zabránilo kondenzácii vzduchu alebo nasatiu kvapaliny. Pri otvorenej polohe ventilu nad nádobou sa po niekoľkých minútach odsávaním odstráni vzduch. Ak je to potrebné, musí sa postup odplynenia opakovať niekoľkokrát.

Obrázok 3a



Obrázok 3b



▼**M1**

Keď sa vzorka pri uzatvorenom ventile zahreje, tlak pary narastá. Toto zmení rovnováhu kvapaliny v trubici v tvare U. Na kompenzovanie tohto javu sa do prístroja cez ventil vpúšťa dusík alebo vzduch dovtedy, kým sa diferenciálny indikátor tlaku opäť neustáli na nulovej hodnote. Tlak, ktorý je na to potrebný, sa môže odčítať z manometra alebo z presného prístroja. Tento tlak zodpovedá tlaku pary testovanej látky pri teplote merania. Ak sa použije prístroj opísaný na obrázku 3b, tlak pary sa odčítava priamo.

Teplotná závislosť tlaku pary sa stanovuje v primerane krátkych intervaloch (spolu približne 5 až 10 meracích bodov) až po požadované maximum teploty.

Odčítania nízkych teplôt sa musia opakovať ako kontrola. Ak sa hodnoty získané z opakovaných odčítaní nezhodujú s krivkou získanou pre stúpajúcu teplotu, môže to byť následkom jednej z uvedených skutočností:

i) testovaná vzorka ešte obsahuje vzduch (napríklad materiály s vysokou viskozitou) alebo nízkovriace látky, ktorý sa uvoľňuje alebo ktoré sa uvoľňujú počas zahrievania;

ii) testovaná látka podlieha chemickej reakcii v skúmanom teplotnom rozmedzí (napr. rozklad alebo polymerizácia).

1.5.3. **Metóda s s použitím izoteniskopu**

1.5.3.1. *Princíp*

Izoteniskop (6) je založený na princípe statickej metódy. Pri tejto metóde sa vzorka umiestni do banky, ktorá sa udržiava pri konštantnom tlaku a je pripojená k manometru a vákuovej pumpe. Nečistoty prchavejšie ako testovaná látka sa odstránia odplynením pri zníženom tlaku. Tlak pary vzorky pri zvolených teplotách sa vyrovnáva známym tlakom inertného plynu. Izoteniskop bol vyvinutý na meranie tlaku pary určitých kvapalných uhľovodíkov, ale je vhodný aj na skúmanie tuhých látok. Metóda obvykle nie je vhodná pre viaczložkové systémy. Výsledky sú ovplyvnené len malými chybami v prípade vzoriek, ktoré obsahujú neprchavé nečistoty. Odporúčané rozmedzie je 10^2 až 10^5 Pa.

1.5.3.2. *Prístroje*

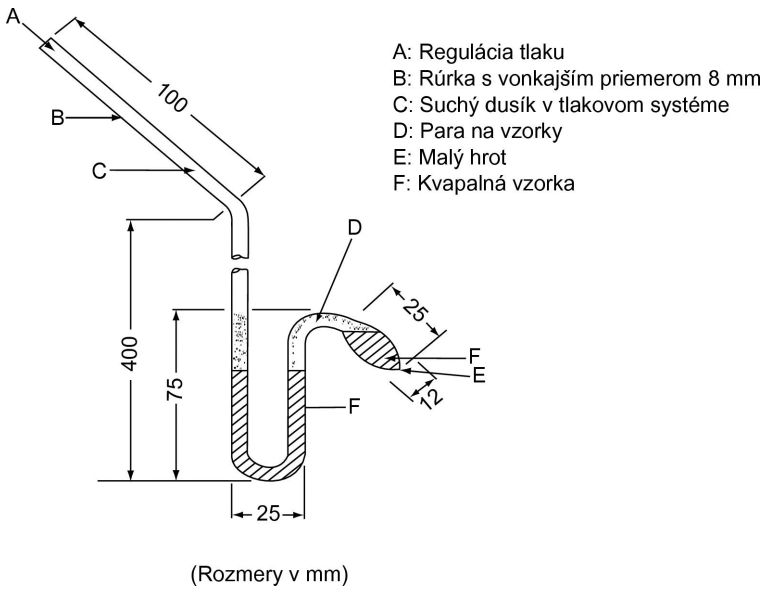
Príklad meracieho prístroja je znázornený na obrázku 4. Úplný opis možno nájsť v ASTM D 2879 – 86 (6).

▼**M1**

1.5.3.3. *Postup*

V prípade kvapalín samotná testovaná látka slúži ako kvapalina v diferenciálnom manometri. Množstvo kvapaliny, ktoré je dostatočné na zaplnenie banky a krátkeho ramena manometra, sa umiestni do izoteniskopu. Izoteniskop sa napojí na vákuový systém a vákuuje, potom sa naplní dusíkom. Vákuovanie a prečistenie systému sa opakuje dvakrát, aby sa odstránil reziduálny kyslík. Naplnený izoteniskop sa umiestni v horizontálnej polohe tak, aby sa testovaná vzorka rozšírila v tenkej vrstve vo vzorkovej banke a manometri. Tlak systému sa redukuje na 133 Pa a vzorka sa mierne zahrieva, až kým nezačne vrieť (odstránenie rozpustených plynov). Izoteniskop sa potom umiestni tak, aby sa vzorka opäť vrátila do banky a naplnila krátke rameno manometra. Tlak sa udržiava na 133 Pa. Vytiahnutý hrot banky so vzorkou sa zohrieva malým plameňom dovtedy, kým sa uvoľnená para zo vzorky nerozšíri v dostatočnej miere na to, aby vytlačila časť vzorky z hornej časti banky a ramena manometra do manometra, vytvoriac tak plynom naplnený priestor bez prítomnosti dusíka. Izoteniskop sa potom umiestni do kúpeľa s konštantnou teplotou a tlak dusíka sa nastaví tak, aby sa rovnal tlaku vzorky. V rovnovážnom stave sa tlak dusíka rovná tlaku pary testovanej látky.

Obrázok 4



(Rozmery v mm)

V prípade tuhých látok a v závislosti od tlakového a teplotného rozmedzia sa použijú manometrové kvapaliny, napr. silikónové kvapaliny alebo ftaláty. Odplynená manometrová kvapalina sa naleje do vydutiny na dlhom ramene izoteniskopu. Potom sa tuhá látka určená na skúmanie umiestni do banky a odplyní sa pri zvýšenej teplote. Po tomto úkone sa izoteniskop nakloní tak, aby tlakomerová kvapalina mohla natiecť do trubice v tvare U.

▼M1

1.5.4. **Výtoková metóda: váhy na meranie tlaku pary** (7)

1.5.4.1. *Princíp*

Vzorka testovanej látky sa zahrieva v malej piecke a umiestni do vákuového zvonu. Piecka je prikrytá vekom s malými otvormi známych priemerov. Para testovanej látky, ktorá uniká z jedného z otvorov, sa nasmeruje na misku citlivých váh, ktoré sa tiež nachádzajú vo vákuovom zvone. V niektorých modeloch môže byť miska váh obklopená chladiacou nádobou zabezpečujúcou odvádzanie tepla smerom von prenosom tepla a chladená sálaním tak, aby sa unikajúca para na nej kondenzovala. Impulz prúdu pary pôsobí na váhy ako sila. Tlak pary možno odvodiť dvomi spôsobmi: priamo zo sily pôsobiacej na misku váh a tiež z rýchlosti odparovania s použitím Hertzovej-Knudsenovej rovnice (2):

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

kde:

G = rýchlosť odparovania (kg s^{-1} m^{-2})

M = mólová hmotnosť (g mol^{-1})

T = teplota (K)

R = všeobecná plynová konštanta (J mol^{-1} K^{-1})

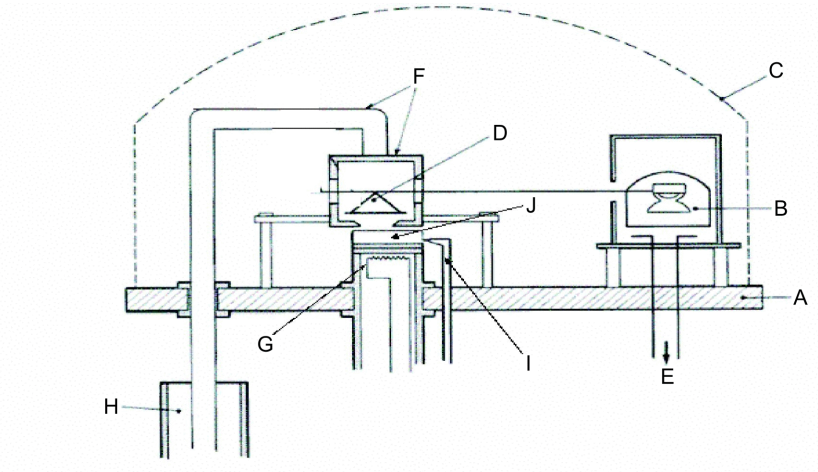
P = tlak pary (Pa)

Odporúčané rozmedzie je 10^{-3} až 1 Pa.

1.5.4.2. *Prístroje*

Všeobecný princíp prístroja je znázornený na obrázku 5.

Obrázok 5



A: Podložka

B: Pohyblivá cievka

C: Vákuový zvon

D: Váhy s miskou

E: Vákuový merací prístroj

F: Chladiaci box a chladiaca tyč

G: Odparovacia piecka

H: Dewarova nádoba s tekutým dusíkom

I: Meranie teploty vzorky

J: Testovaná látka

▼M1

1.5.5. **Výtoková metóda: Knudsenova komôrka**

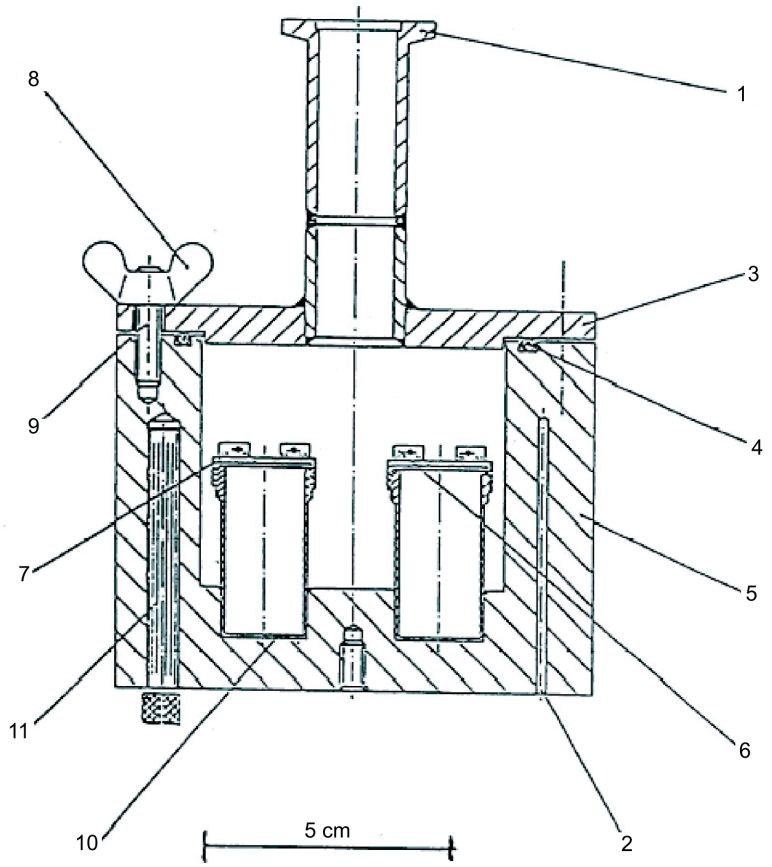
1.5.5.1. *Princíp*

Táto metóda je založená na odhade hmotnosti testovanej látky, ktorá za jednotku času unikla z Knudsenovej komôrky (8) vo forme pary cez mikrootvor v ultravákuových podmienkach. Hmotnosť výtokovej uniknutej pary sa dá zistiť buď stanovením úbytku hmotnosti komôrky, alebo kondenzáciou pary pri nízkej teplote a stanovením množstva vyprchanej látky využitím chromatografie. Tlak pary sa vypočíta s použitím Hertzovej-Knudsenovej rovnice (pozri oddiel 1.5.4.1) s korekčnými koeficientmi, ktoré závisia od parametrov prístroja (9). Odporúčané rozmedzie je 10^{-10} až 1 Pa (10) (11) (12) (13) (14).

1.5.5.2. *Prístroje*

Všeobecný princíp prístroja je znázornený na obrázku 6.

Obrázok 6



1:	Pripojenie na vákuum	7:	Veko so závitom
2:	Dutina na zasunutie platinového odporového teplomera alebo na meranie a reguláciu teploty	8:	Krídlové matice
3:	Veko vákuovej nádoby	9:	Svorníky
4:	Tesniaci O-krúžok	10:	Efúzne komôrky z nehrdzavejúcej ocele
5:	Hliníková vákuová nádoba	11:	Ohrievacie teleso
6:	Zariadenie na inštalovanie a vyberanie efúznych komôr		

▼M1

1.5.6. **Výtoková metóda: izotermálna termogravimetria**

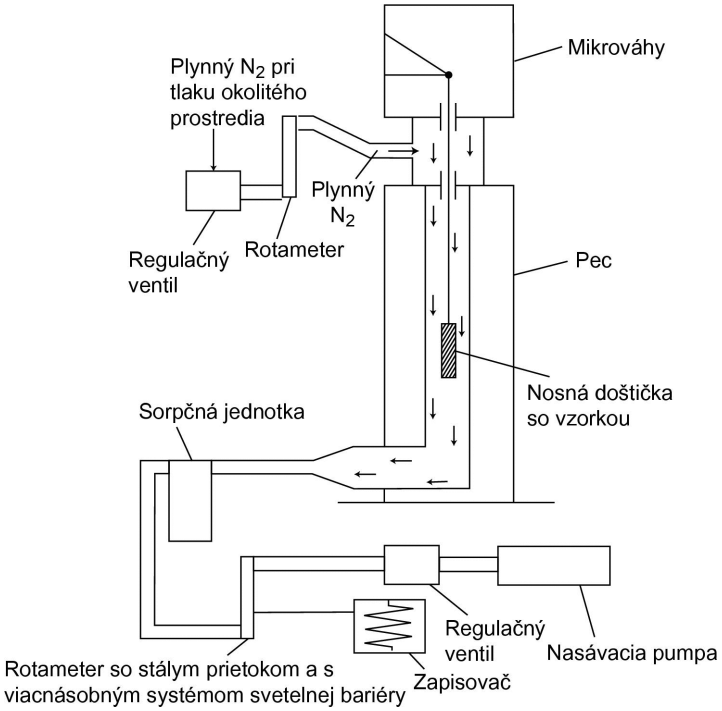
1.5.6.1. *Princíp*

Metóda je založená na stanovení zvýšených rýchlostí odparovania v prípade testovanej látky pri zvýšených teplotách a tlaku okolitého prostredia s použitím termogravimetrie (10) (15) (16) (17) (18) (19) (20). Rýchlosti odparovania v_T vznikajú na základe vystavenia zvolenej zlúčeniny pomalému prúdu inertného plynu a sledovania úbytku hmotnosti pri určených izotermických teplotách T v kelvinoch počas príslušných časových období. Tlaky pary p_T sa vypočítajú z hodnôt v_T s použitím lineárneho vzťahu medzi logaritmom tlaku pary a logaritmom rýchlosti odparovania. V prípade potreby sa môže urobiť extrapolácia na teploty 20 °C a 25 °C regresnou analýzou log p_T proti 1/T. Táto metóda je vhodná pre látky, ktoré majú tlak pár rovnako nízky ako 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) a stupeň čistoty čo možno najbližšie k 100 %, aby sa zabránilo chybnej interpretácii nameraných úbytkov hmotnosti.

1.5.6.2. *Prístroje*

Všeobecný princíp experimentálnej zostavy je znázornený na obrázku 7.

Obrázok 7



Nosná doštička so vzorkou, ktorá visí na mikrováhach v komore s regulovanou teplotou, sa umiestni do prúdu suchého dusíka, ktorý unáša odparené molekuly testovanej látky. Po opustení komory sa prúd plynu prečistí na sorpčnej jednotke.

1.5.6.3. *Postup*

Testovaná látka sa aplikuje na povrch zdrsnenej sklenej doštičky v homogénnej vrstve. V prípade tuhých látok sa doštička rovnomerne navlhčí roztokom testovanej látky vo vhodnom rozpúšťadle a vysuší v inertnej atmosfére. Na meranie sa pokrytá doštička umiestni do termogravimetrického analyzátora a následne sa kontinuálne meria úbytok hmotnosti ako funkcia času.

▼M1

Rýchlosť odparovania v_T sa pri stanovenej teplote vypočíta z úbytku hmotnosti Δm doštičky so vzorkou na základe

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

kde F je povrchová plocha nanesených testovaných látok, obvykle povrchová plocha doštičky so vzorkou, a t je čas úbytku hmotnosti Δm.

Tlak pary p_T sa vypočíta na základe toho, že je funkciou rýchlosti odparovania v_T:

$$\mathrm{Log}\ p_T = C + D \log v_T$$

kde C a D sú konštanty špecifické pre používané experimentálne usporiadanie závislé od priemeru komory, kde sa uskutočňuje meranie, a od prietokovej rýchlosti plynu. Tieto konštanty sa musia stanoviť vopred tak, že sa odmeria súbor zlúčenín so známym tlakom pary a regresiou log p_T proti log v_T (11) (21) (22).

Vzťah medzi tlakom pary p_T a teplotou T v kelvinoch je daný vzorcom

$$\mathrm{Log}\ p_T = A + B\ 1/T$$

kde A a B sú konštanty získané regresiou log p_T proti 1/T. Na základe tejto rovnice sa extrapoláciou môže tlak pary vypočítať pre akúkoľvek inú teplotu.

1.5.7. **Metóda plynovej saturácie** (23)

1.5.7.1. *Princíp*

Prúd inertného nosného plynu sa prepúšťa cez vzorku testovanej látky alebo nad ňou dostatočne pomaly, aby sa plyn nasýtil parou testovanej látky. Dosiahnutie nasýtenia v plynnej fáze je mimoriadne dôležité. Transportovaná látka sa zachytí obvykle s použitím sorbentu a zmeria sa jej množstvo. Ako alternatíva k zachyteniu pary a následnej analýze sa môžu použiť analytické techniky typu „in-train“ ako plynová chromatografia na stanovenie množstva transportovanej látky. Tlak pary sa vypočíta na základe predpokladu, že je dodržaný zákon ideálneho plynu a že celkový tlak zmesi plynov sa rovná sume tlakov plynov tvoriacich zmes. Parciálny tlak testovanej látky, t. j. tlak pary, sa vypočíta na základe známeho objemu celkového plynu a hmotnosti transportovaného materiálu.

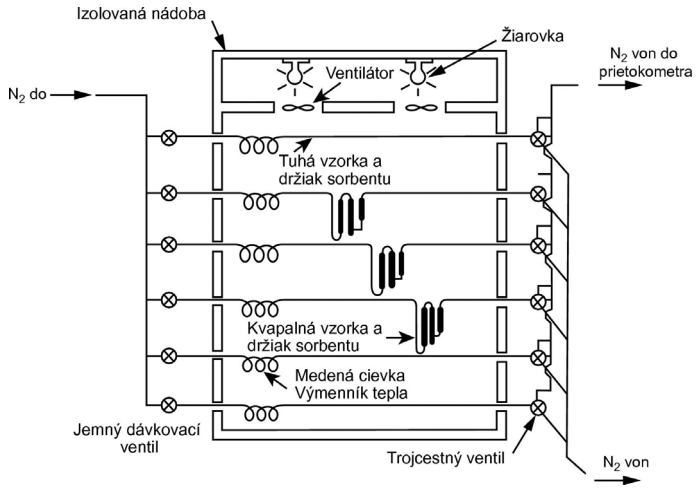
Postup plynovej saturácie možno použiť na tuhé alebo kvapalné látky. Môže sa použiť pre tlaky pár až do 10^{-10} Pa (10) (11) (12) (13) (14). Metóda je najspoľahlivejšia pre tlaky pár nižšie ako 10^3 Pa. Pre vyššie tlaky pár ako 10^3 Pa sú obvykle nadhodnotené pravdepodobne kvôli vytváraniu aerosólu. Keďže merania tlaku pary sa uskutočňujú pri teplote miestnosti, nie je potrebná extrapolácia údajov z vysokých teplôt a vyhne sa tak extrapolácii vysokej teploty, ktorá môže často spôsobovať vážne chyby.

1.5.7.2. *Prístroje*

Postup vyžaduje, aby sa použila nádoba s konštantnou teplotou. Na obrázku 8 je znázornená nádoba, v ktorej sa nachádzajú držiaky na tri tuhé a tri kvapalné vzorky, ktoré umožňujú trojnásobnú analýzu buď tuhej, alebo kvapalnej vzorky. Teplota je regulovaná v rozmedzí ± 0,5 °C alebo viac.

▼**M1**

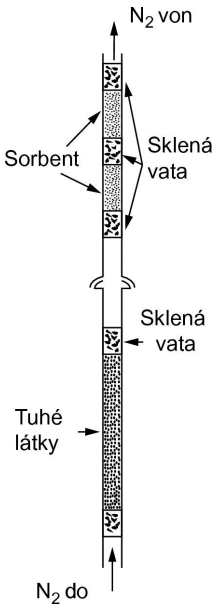
Obrázok 8



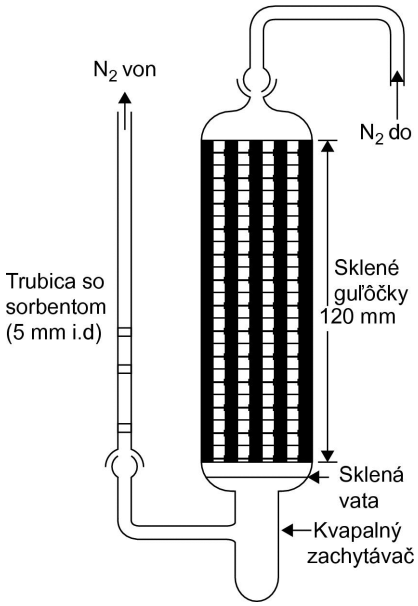
Vo všeobecnosti sa ako inertný nosný plyn používa dusík, ale príležitostne sa môže vyžadovať aj použitie iného plynu (24). Nosný plyn musí byť suchý. Prúd plynu sa rozdelí do 6 prúdov regulovaných ihlovými ventilmi (otvor približne 0,79 mm) a prúdi do nádoby cez medenú trubicu s vnútorným priemerom 3,8 mm. Po vyrovnaní teploty plyn prúdi cez vzorku a zachytávač so sorbentom a opúšťa nádobu.

Tuhé vzorky sa vložia do sklenej rúrky s vnútorným priemerom 5 mm medzi zátky zo sklenej vaty (pozri obrázok 9). Na obrázku 10 je znázornený držiak kvapalnej vzorky a sorpčný systém. Najlepšie reprodukovateľnou metódou na meranie tlaku pary kvapalín je naniesť kvapalinu na sklené guľôčky alebo na inertný sorbent, ako napr. kremeň, a naplniť držiak týmito guľôčkami. Alternatívne sa môže prúdenie nosného plynu nastaviť tak, aby prechádzal cez hrubú fritu a prebublal cez kolónu testovanej kvapalnej látky.

Obrázok 9



Obrázok 10



▼M1

Sorpčný systém sa skladá z vrchnej a spodnej sorpčnej časti. Pri veľmi nízkych tlakoch pary sa na sorbente zachytia len veľmi malé množstvá a adsorpcia na sklenej vate a sklenej trubici medzi vzorkou a sorbentom môže spôsobiť vážny problém.

Ďalším účinným spôsobom na získanie odpareného materiálu sú zachytávače chladené tuhým CO_2. Nespôsobujú žiadny protitlak na saturátorovú kolónu a zachytený materiál sa tiež veľmi jednoducho kvantitatívne uvoľňuje.

1.5.7.3. *Postup*

Prietoková rýchlosť unikajúceho nosného plynu sa meria pri izbovej teplote. Prietoková rýchlosť sa počas experimentu často kontroluje, aby sa zabezpečila správna hodnota pre celkový objem nosného plynu. Uprednostňuje sa priebežné sledovanie hmotnostným prietokomerom. Nasýtenie plynnej fázy môže vyžadovať značný čas kontaktu, a preto aj pomerne nízke prietokové rýchlosti plynu (25).

Na konci experimentu sa obidve časti sorbentu, vrchná a spodná, analyzujú samostatne. Zlúčenina v každej časti sa pridaním rozpúšťadla desorbuje. Výsledné roztoky sa kvantitatívne analyzujú na stanovenie hmotnosti desorbovanej z každej časti. Výber analytickej metódy (aj výber sorbentu a rozpúšťadla na desorpciu) je určený vlastnosťami testovaného materiálu. Účinnosť desorpcie sa stanoví vstreknutím známeho množstva vzorky na sorbent, jej desorpciou a analýzou získaného množstva. Je dôležité skontrolovať účinnosť desorpcie a koncentráciu, ktorá je rovnaká alebo približná ako koncentrácia vzorky, pri podmienkach testu.

Na zabezpečenie toho, aby sa nosný plyn nasýtil testovanou látkou, sa používajú tri rozdielne prietokové rýchlosti. Ak vypočítaný tlak pary nevykazuje žiadnu závislosť od prietokovej rýchlosti, predpokladá sa, že plyn je nasýtený.

Tlak pary sa vypočíta na základe rovnice:

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

kde:

p = tlak pary (Pa)

W = hmotnosť odparenej testovanej látky (g)

V = objem nasýteného plynu (m^3)

R = všeobecná plynová konštanta 8,314 (J mol^{-1} K^{-1})

T = teplota (K)

M = mólová hmotnosť testovanej látky (g mol^{-1}).

Namerané objemy musia byť opravené z hľadiska tlakových a teplotných rozdielov medzi prietokomerom a saturátorom.

▼M1

1.5.8. **Rotujúca guľôčka**

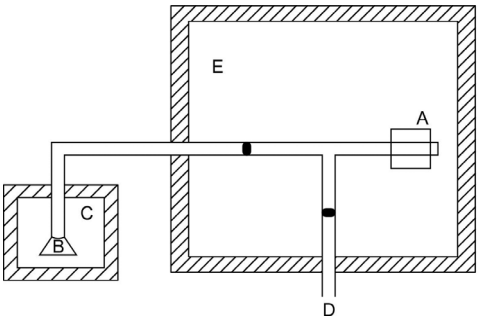
1.5.8.1. *Princíp*

Táto metóda využíva meradlo viskozity rotujúceho rotora, v ktorom je meracím prvkom malá oceľová guľôčka, ktorá je zavesená do magnetického poľa, v ktorom rotuje (26) (27) (28). Snímacie cievky umožňujú meranie jej rýchlosti otáčania. Ak guľôčka dosiahla danú rotačnú rýchlosť, približne 400 otáčok za sekundu, ďalšie budenie sa zastaví a následkom trenia plynu dochádza k spomaľovaniu. Pokles rýchlosti otáčania sa meria ako funkcia času. Tlak pary sa odvodí zo spomalenia oceľovej guľôčky, ktoré je závislé od tlaku. Odporúčané rozmedzie je 10^{-4} až 0,5 Pa.

1.5.8.2. *Prístroje*

Schematický nákres pokusného systému je zobrazený na obrázku 11. Meracia hlava je umiestnená v termostaticky upravovanom uzavretom priestore s presnosťou regulácie na 0,1 °C. Nádoba so vzorkou je umiestnená v termostaticky upravovanom uzavretom priestore tiež s presnosťou regulácie na 0,1 °C. Všetky ostatné časti zostavy sa udržiavajú pri vyššej teplote, aby sa zabránilo kondenzácii. Celý prístroj je napojený na vysokovákuový systém.

Obrázok 11



A: Snímacia hlava rotujúceho rotora
B: Komôrka s testovacou látkou
C: Termostat
D: Podtlaková rúrka (turbočerpadlo)
E: Vzduchový termostat

2. **ÚDAJE A SPRÁVY**

2.1. ÚDAJE

Tlak pary zo všetkých predchádzajúcich metód sa musí stanoviť aspoň pre dve teploty. V rozmedzí od 0 °C do 50 °C sa odporúčajú tri alebo viacej teplôt, aby sa dala skontrolovať lineárnosť krivky tlaku plynu. V prípade výtokovej metódy (Knudsenova komôrka a izotermická termogravimetria) a metód plynovej saturácie sa pre stanovenie teplotného rozmedzia odporúča 120 °C až 150 °C namiesto 0 °C až 50 °C.

2.2. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

— použitú metódu,

▼M1

— presnú špecifikáciu látky (identitu a prímesi) a opatrenia v rámci predbežnej purifikácie testovanej látky, ak sa uskutočnili,

— minimálne dve tlakové a teplotné hodnoty a prednostne tri alebo viac sa vyžadujú v rozmedzí od 0 °C do 50 °C (alebo 120 °C až 150 °C),

— aspoň jedna teplota musí byť pod 25 °C, ak je to technicky možné na základe zvolenej metódy,

— všetky pôvodné údaje,

— log p verzus 1/T krivka,

— odhad tlaku pary pri 20 °C alebo 25 °C.

Ak sa pozoruje premena (zmena skupenstva, rozklad), treba uviesť nasledujúce informácie:

— charakter zmeny,

— teplotu, pri ktorej sa zmena prejavuje pri atmosférickom tlaku,

— tlak pary pri 10 °C a 20 °C pod teplotou premeny a 10 °C a 20 °C nad touto teplotou (s výnimkou premeny z tuhej látky na plyn).

V správe z testu musia byť uvedené všetky informácie a poznámky, ktoré sú dôležité pre interpretáciu výsledkov testu, najmä týkajúce sa nečistôt a fyzikálneho stavu (skupenstva) testovanej látky.

3. **POUŽITÁ LITERATÚRA**

1. Úradný vestník Európskych spoločenstiev L 383A, s. 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

Dodatok

Metóda odhadu

ÚVOD

Predbežne vypočítané hodnoty tlaku pary sa môžu použiť na:

— rozhodnutie, ktorá z existujúcich pokusných metód je najvhodnejšia,

— poskytnutie odhadu alebo medznej hodnoty v prípadoch, keď sa pokusná metóda z technických príčin nemôže uplatniť.

METÓDA ODHADU

Tlak pary kvapalín a tuhých látok sa môže odhadnúť s s použitím modifikovanej Watsonovej korelácie (a). Jediným potrebným pokusným údajom je normálna teplota varu. Táto metóda sa dá použiť v celom rozmedzí tlaku od 10^5 Pa do 10^{-5} Pa.

Podrobné informácie o tejto metóde sú uvedené v príručke Handbook of Chemical Property Estimation Methods (Príručka metód na odhadovanie vlastností) (b). Pozri aj OECD Environmental Monograph (Monografia OECD o životnom prostredí), č. 67 písm. c).

POSTUP VÝPOČTU

Tlak pary sa vypočíta takto:

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

kde:

T = daná teplota

T_b = normálny bod varu

P_{VP} = tlak pary pri teplote T

ΔH_{Vb} = výparné teplo

ΔZ_b = koeficient stlačiteľnosti (odhadovaný pri 0,97)

m = empirický koeficient závislý od fyzikálneho skupenstva pri danej teplote T.

Ďalej

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

kde K_F je empirický koeficient zohľadňujúci polaritu testovanej látky. Pre viaceré typy zlúčenín sú koeficienty K_F uvedené v odkazoch pod písmenom b).

▼**M1**

Často sú k dispozícii údaje, ktoré uvádzajú teplotu varu pri zníženom tlaku. V takom prípade sa tlak pary vypočíta takto:

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

kde T_1 je bod varu pri zníženom tlaku P_1.

SPRÁVA

Ak sa použije metóda odhadu, správa o teste musí obsahovať úplnú dokumentáciu výpočtov.

POUŽITÁ LITERATÚRA

(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. POVRCHOVÉ NAPÄTIE

1. METÓDA

Opísané metódy sú upravené smernicou na vykonávanie OECD testov (1). Základné princípy sú uvedené v odkaze (2).

1.1. ÚVOD

Opísané metódy sú určené na meranie povrchového napätia vodných roztokov.

Pred vykonaním týchto testov sa odporúča získať predbežné informácie o rozpustnosti vo vode, hydrolýznych vlastnostiach a kritickej koncentrácii pre tvorbu micel testovanej látky.

Nasledujúce uvedené metódy sa dajú použiť pre väčšinu chemikálií bez akýchkoľvek obmedzení v spojitosti s ich stupňom čistoty.

Meranie povrchového napätia metódou krúžkového tenzometra sa obmedzuje na vodné roztoky s dynamickou viskozitou nižšou ako približne 200 mPa s.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Entalpia voľnej hladiny na jednotku povrchovej plochy sa vzťahuje na povrchové napätie.

Povrchové napätie sa udáva ako:

N/m (jednotka SI) alebo

mN/m (podjednotka SI)

1 N/m = 10^3dyn/cm

1 N/m = 1 dyn/cm v zastaranej jednotkovej sústave cgs

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky nemusia byť použité vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová látka. V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

Referenčné látky, ktoré pokrývajú široký rozsah povrchových napätí, sú uvedené v odkazoch (1) a (3).

1.4. PRINCÍP METÓD

Metódy sú založené na meraní maximálnej sily, ktorá musí byť vynaložená vertikálne na strmienok alebo krúžok v kontakte s hladinou testovanej kvapaliny umiestnenej v meracej miske na účely jeho oddelenia od tejto hladiny alebo na doštičku s jednou hranou v kontakte s povrchom na účely zdvihnutia filmu, ktorý sa vytvoril.

Látky, ktoré sú rozpustné vo vode pri koncentrácii aspoň 1 mg/l, sú testované vo vodnom roztoku pri jednej koncentrácii.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Tieto metódy sa dajú realizovať s väčšou presnosťou, než aká sa pravdepodobne bude požadovať na environmentálne zhodnocovanie.

▼B

1.6. OPIS METÓD

Roztok testovanej látky sa pripraví v destilovanej vode. Koncentrácia tohto roztoku by mala predstavovať 90 % nasýtenej rozpustnosti testovanej látky vo vode; keď táto koncentrácia prevyšuje 1 g/l, na účely testovania sa použije koncentrácia 1 g/l. Látky s rozpustnosťou vo vode nižšou ako 1 mg/l sa nemusia testovať.

1.6.1. **Doštičková metóda**

Pozri technické normy ISO 304 a NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films) (Povrchovo aktívne činidlá – stanovenie povrchového napätia pomocou kvapalinových filmov).

1.6.2. **Strmienková metóda**

Pozri technické normy ISO 304 a NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films) (Povrchovo aktívne činidlá – stanovenie povrchového napätia pomocou kvapalinových filmov).

1.6.3. **Krúžková metóda**

Pozri technické normy ISO 304 a NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films) (Povrchovo aktívne činidlá – stanovenie povrchového napätia pomocou kvapalinových filmov).

1.6.4. **Harmonizovaná krúžková metóda podľa OECD**

1.6.4.1. *Prístroje*

Na účely tohto merania postačujú komerčne dostupné tenzometre. Pozostávajú z nasledujúcich častí:

— pohyblivá doska na vzorky,

— systém na meranie sily,

— meracie teleso (krúžok),

— meracia nádoba.

1.6.4.1.1. Pohyblivá doska na vzorky

Pohyblivá doska na vzorky sa používa ako podložka pod termoregulovanú meraciu nádobu obsahujúcu kvapalinu určenú na testovanie. Spolu s meracím systémom je prichytená na stojan.

1.6.4.1.2. Systém na meranie sily

Systém na meranie sily (pozrite obrázok) je umiestnený nad dosku na vzorky. Odchýlka merania sily nemá presahovať hodnotu ± 10^{-6} N, zodpovedajúc tak dovolenej chybe ± 0,1 mg pri meraní hmotnosti. Vo väčšine prípadov je meracia stupnica komerčne dostupných tenzometrov kalibrovaná v mN/m, takže povrchové napätie môže byť odčítané priamo v mN/m s presnosťou na 0,1 mN/m.

▼B

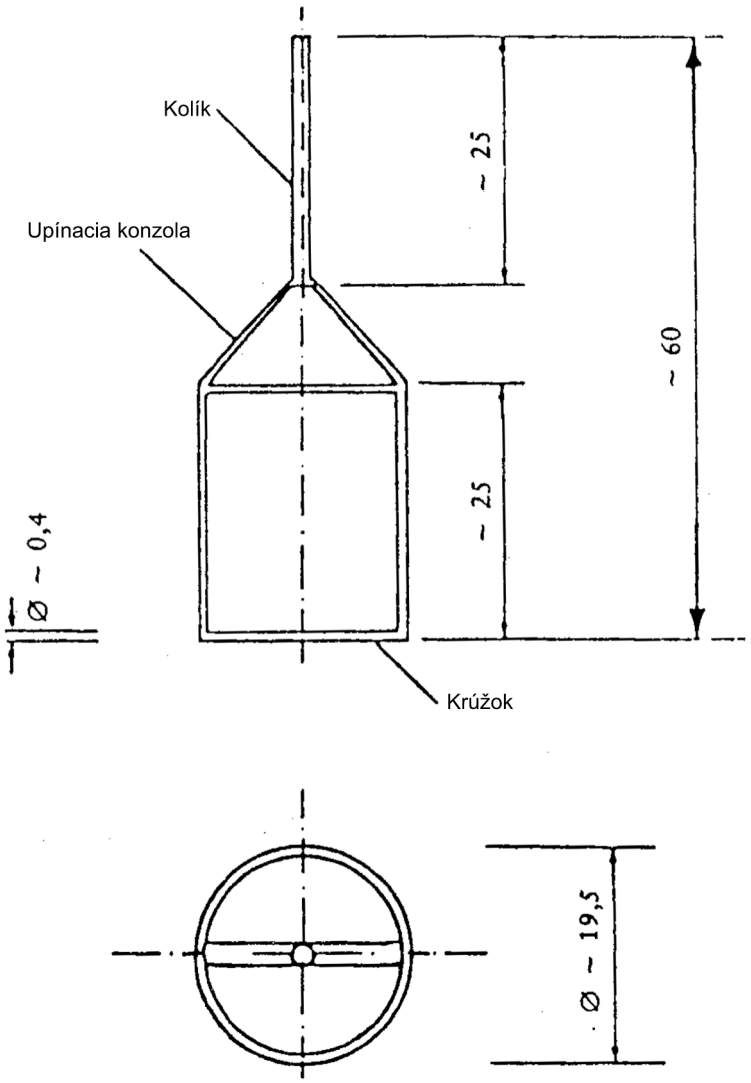
1.6.4.1.3. Meracie teleso (krúžok)

Krúžok je zvyčajne vyrobený z platinovo-irídiového drôtu s hrúbkou približne 0,4 mm a so stredným obvodom 60 mm. Drôtený krúžok je zavesený horizontálne na kovový kolík a drôtenú upínaciu konzolu, aby sa tak vytvorilo prepojenie so systémom na meranie sily (pozri obrázok).

Obrázok

Meracie teleso (krúžok)

(Všetky rozmery sú vyjadrené v milimetroch)



1.6.4.1.4. Meracia nádoba

Meracia nádoba určená pre testovanú látku musí byť termoregulovaná sklená nádoba. Musí mať také vlastnosti, aby počas merania teplota testovaného kvapalinového roztoku a plynová fáza nad jeho povrchom zostali konštantné a aby sa testovaná vzorka nemohla odparovať. Vyhovujúce sú valcovité sklené nádoby s vnútorným priemerom najmenej 45 mm.

▼B

1.6.4.2. *Príprava prístroja*

1.6.4.2.1. Čistenie

Sklené nádoby musia byť dôkladne vyčistené. Ak je to potrebné, musia sa umyť horúcou kyselinou chrómsírovou a následne sirupovitou kyselinou fosforečnou (83 až 98 hmotnostných % H_3PO_4), dôkladne opláchnuť pod vodou z vodovodu a nakoniec umyť v dvakrát destilovanej vode, až kým sa nedosiahne neutrálna reakcia, a potom sa musia osušiť alebo vymyť časťou kvapalnej vzorky určenej na testovanie, resp. meranie.

Krúžok sa musí najprv dôkladne opláchnuť vo vode, aby sa odstránili všetky látky, ktoré sú rozpustné vo vode, potom sa krátko ponorí do kyseliny chrómsírovej, umyje v dvakrát destilovanej vode, až kým sa nedosiahne neutrálna reakcia, a nakoniec sa krátko ohreje nad metanolovým plameňom.

Upozornenie:

Kontaminácia látkami, ktoré sa nerozpustili alebo nerozrušili kyselinou chrómsírovou alebo kyselinou fosforečnou, ako napríklad silikónmi, sa musí odstrániť pomocou vhodného organického rozpúšťadla.

1.6.4.2.2. Kalibrácia prístroja

Kalibrácia prístroja spočíva v kontrole nulového bodu a jeho nastavení takým spôsobom, aby označenie prístroja umožňovalo spoľahlivé stanovenie hodnôt v mN/m.

Inštalácia:

Prístroj musí byť vyvážený napríklad pomocou liehovej vodováhy na tenzometrovej základni nastavovacími skrutkami umiestnenými naspodku základovej platne.

Nastavenie nulového bodu:

Po inštalácii krúžku na prístroj a pred jeho ponorením do kyseliny musí byť ukazovateľ tenzometra nastavený na nulu a musí sa skontrolovať, či je krúžok rovnobežný s hladinou kvapaliny. Na tento účel možno použiť hladinu kvapaliny ako zrkadlo.

Kalibrácie:

Vlastná testová kalibrácia sa môže uskutočniť jedným z týchto dvoch postupov:

a) použitím závažia: postup používajúci závažia známej hmotnosti medzi 0,1 g a 1,0 g umiestnené na krúžku. Kalibračná konštanta (konštanta pri ciachovaní), Φ_a, ktorou musia byť vynásobené všetky hodnoty odčítané na inštrumente, sa stanoví podľa rovnice (1):

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a}$$

kde:

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

m = hmotnosť závažia (g)

g = gravitačné zrýchlenie (981 cm s^{-2} pri hladine mora)

b = stredný obvod krúžku (cm)

σ_a = údaj na stupnici tenzometra po umiestnení závažia na krúžok (mN/m);

▼B

b) použitím vody: postup používajúci čistú vodu, ktorej povrchové napätie sa napríklad pri teplote 23 °C rovná 72,3 mN/m. Tento postup sa dá uskutočniť rýchlejšie ako hmotnostná kalibrácia, len je tu stále riziko, že povrchové napätie vody bude skreslené stopami kontaminácie povrchovo aktívnymi činidlami.

Kalibračná konštanta, Φ_b, ktorou musia byť vynásobené všetky údaje odčítané na prístroji, sa stanoví podľa rovnice (2):

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g}$$

kde:

σ_o = hodnota citovaná v literatúre pre povrchové napätie vody (mN/m)

σ_g = nameraná hodnota povrchového napätia vody (mN/m) obidve hodnoty pri tej istej teplote.

1.6.4.3. *Príprava vzoriek*

Pri príprave vodných roztokov látok určených na testovanie treba použiť požadované koncentrácie vo vode, pričom roztoky nesmú obsahovať žiadne nerozpustené látky.

Roztok sa musí udržiavať pri konštantnej teplote (± 0,5 °C). Keďže povrchové napätie roztoku sa v meracej nádobe mení v priebehu času, treba uskutočniť viacero meraní v rozličných časoch, ako aj vynášať hodnoty vo forme krivky diagramu ako funkcie času. Keď sa ďalšie zmeny už neobjavia, dosiahol sa rovnovážny stav.

Prach a plynová kontaminácia inými látkami rušivo pôsobia na výsledky meraní. Celý postup sa preto uskutoční pod ochranným krytom.

1.6.5. **Podmienky skúšania**

Meranie sa musí uskutočniť pri teplote približne 20 °C a táto teplota sa udržiava v rozmedzí ± 0,5 °C.

1.6.6. **Realizácia testu**

Roztoky určené na meranie treba premiestniť do dôkladne očistenej meracej nádoby, pričom treba dbať na to, aby sa zabránilo peneniu. Meracia nádoba sa potom položí na dosku prístroja. Dosku potom treba dvíhať až dovtedy, kým sa krúžok neponorí pod hladinu roztoku určeného na meranie. Doska sa potom pozvoľna a rovnomerne spúšťa nadol (rýchlosťou približne 0,5 cm/min), akoby sme krúžok chceli oddeliť od hladiny kvapaliny, a to až dovtedy, kým sa nedosiahne maximálna sila. Vrstva kvapaliny prilipnutá ku krúžku sa však od neho nesmie oddeliť. Po ukončení merania treba krúžok opäť ponoriť pod hladinu a merania sa takto opakujú až dovtedy, kým sa nedosiahne konštantná hodnota povrchového napätia. Čas, ktorý uplynul od premiestnenia testovaného roztoku do meracej nádoby, sa musí zaznamenať pre každé jedno stanovenie. Hodnoty sa odčítajú vždy pri maximálnej sile vyvinutej pri snahe o oddelenie krúžku od povrchu hladiny kvapaliny.

▼B

2. **ÚDAJE**

Na výpočet povrchového napätia sa hodnota odčítaná v mN/m zo stupnice prístroja najprv vynásobí kalibračným koeficientom Φ_a alebo Φ_b (v závislosti od použitého kalibračného postupu). Takto získame hodnotu, ktorá je iba približná, a vyžaduje si preto korekciu.

Harkins a Jordan (4) empiricky stanovili korekčné koeficienty pre hodnoty povrchového napätia meraného krúžkovou metódou, ktoré sú závislé od rozmerov krúžku, hustoty testovanej kvapaliny a od jej povrchového napätia.

Keďže je veľmi ťažké stanoviť korekčný koeficient pre každé jedno samostatné meranie z Harkinsových a Jordanových tabuliek, na účely výpočtu povrchového napätia vodných roztokov možno použiť zjednodušený postup odčítania korekčných hodnôt povrchového napätia priamo z tabuľky. (Na odčítanie v rozmedzí tabuľkových hodnôt treba použiť interpoláciu.)

Tabuľka

Korekcia nameraného povrchového napätia

Platí iba pre vodné roztoky, $\rho = 1\ g/cm^3$

r	= 9,55 mm (stredný polomer krúžku)
r	= 0,185 mm (polomer drôtu, z ktorého je krúžok zhotovený)

Experimentálna hodnota (mN/m)	Korigovaná hodnota (mN/m}	
	Kalibrácia závažiami [pozri bod 1.6.4.2.2 písm. a)]	Kalibrácia vodou [pozri bod 1.6.4.2.2 písm. 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

Experimentálna hodnota (mN/m)	Korigovaná hodnota (mN/m}	
	Kalibrácia závažiami [pozri bod 1.6.4.2.2 písm. a)]	Kalibrácia vodou [pozri bod 1.6.4.2.2 písm. 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	—

Táto tabuľka bola zostavená na základe Harkinsovej-Jordanovej korekcie. Je podobná tabuľke uvedenej v technickej norme DIN Standard (DIN 53914) pre vodu a vodné roztoky (hustota $\rho = 1 g/cm^3$) a je vhodná pre komerčne dostupný krúžok s rozmermi R = 9,55 mm (stredný polomer krúžku) a r = 0,185 mm (polomer drôtu, z ktorého je krúžok zhotovený). Tabuľka udáva korigované hodnoty pre merania povrchového napätia vykonané po kalibrácii závažiami alebo vodou.

Alternatívne, bez predchádzajúcej kalibrácie, sa povrchové napätie môže vypočítať podľa tohto vzorca:

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

kde:

F = sila nameraná na dynamometri v bode prerušenia filmu

R = polomer krúžku

f = korekčný (opravný) koeficient (1)

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

— použitú metódu,

— typ použitej vody alebo roztoku,

— presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímesi),

— výsledky merania: povrchové napätie (hodnoty odčítané zo stupnice) uvádzajúce jednotlivé samostatné odčítania hodnôt a ich aritmetický priemer, ako aj korigované stredné hodnoty (zohľadňujúce koeficient zariadenia a korekčnú tabuľku),

▼B

— koncentráciu roztoku,

— testovaciu teplotu,

— vek použitého roztoku, obzvlášť čas medzi prípravou a meraním roztoku,

— opis časovej závislosti povrchového napätia po premiestnení roztoku do meracej nádoby,

— všetky informácie a poznámky, ktoré sú dôležité pre interpretáciu výsledkov testu, najmä týkajúce sa prímesí a fyzikálneho skupenstva testovanej látky.

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Za predpokladu, že destilovaná voda má povrchové napätie 72,75 mN/m pri teplote 20 ^{o}C, látky prejavujúce povrchové napätie nižšie ako 60 mN/m za podmienok tejto metódy treba považovať za povrchovo aktívne materiály.

4. **ODKAZY**

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

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

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

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

▼M4

A.6. **ROZPUSTNOSŤ VO VODE**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov (TG) 105 (1995). Táto testovacia metóda je revidovanou verziou pôvodných usmernení TG 105, ktoré boli prijaté v roku 1981. Medzi súčasnou verziou a verziou z roku 1981 nie je žiadny podstatný rozdiel. Zmenil sa najmä formát. Revízia je založená na testovacej metóde EÚ „Rozpustnosť vo vode“ ([1]).

ÚVODNÉ ÚVAHY

2. Rozpustnosť látok vo vode môže byť do značnej miery ovplyvnená prítomnosťou prímesí. Táto testovacia metóda je zameraná na určenie rozpustnosti absolútne čistých látok vo vode, ktoré sú vo vode stabilné a nie sú prchavé. Pred stanovením rozpustnosti vo vode je užitočné získať predbežné informácie o testovanej látke, ako je štruktúrny vzorec, tlak pary, disociačná konštanta a hydrolýza ako funkcia pH.

3. V rámci tejto testovacej metódy sú opísané dve metódy, metóda vypierania z kolóny, ktorá sa týka rozpustnosti nižšej ako 10^{-2} g/l, a banková metóda, ktorá sa týka rozpustnosti vyššej ako 10^{-2} g/l. Takisto je tu opísaný jednoduchý predbežný test. Umožňuje stanovenie približného vhodného množstva vzorky, ktorá sa má použiť v konečnom teste, ako aj čas potrebný na dosiahnutie nasýtenia.

POJMY A JEDNOTKY

4. Rozpustnosť látky vo vode je saturačná hmotnostná koncentrácia látky vo vode pri danej teplote.

5. Rozpustnosť vo vode je vyjadrená ako hmotnosť rozpustenej látky na objem roztoku. Jednotka SI je kg/m^3, ale môže sa použiť aj g/l.

REFERENČNÉ CHEMIKÁLIE

6. Referenčné chemikálie sa pri skúmaní testovanej látky nemusia použiť.

OPIS METÓD

Podmienky testovania

7. Test podľa možnosti prebieha pri teplote 20 ± 0,5 °C. Zvolená teplota by sa mala udržiavať na konštantnej úrovni vo všetkých relevantných súčastiach skúšobného zariadenia.

Predbežný test

8. V rámci postupu, ktorý pozostáva z niekoľkých krokov, sa pri izbovej teplote pridáva čoraz väčší objem vody približne do 0,1 g vzorky (tuhé testované látky musia byť rozomleté na prach) v 10 ml odmernom valci so sklenou zátkou. Po každom pridaní množstva vody sa zmes trepe počas desiatich minút a vizuálne sa skontroluje, či v nej neostali nerozpustené časti vzorky. Ak sa po pridaní 10 ml vody vzorka alebo jej časti nerozpustia,

▼M4

pokus pokračuje v odmernom valci s objemom 100 ml. Približná rozpustnosť je uvedená v tabuľke 1 pod tým objemom vody, v ktorom dôjde k úplnému rozpusteniu testovanej vzorky. Ak je rozpustnosť nízka, na rozpustenie testovanej látky môže byť potrebný dlhší čas a pokus by mal prebiehať aspoň 24 hodín. Ak ani po 24 hodinách látka nie je rozpustená, malo by sa poskytnúť viac času (až 96 hodín) alebo by sa malo vyskúšať ďalšie riedenie, aby sa získala istota, či by sa nemala použiť metóda vypierania z kolóny alebo banková metóda.

Tabuľka 1

ml vody na 0,1 g rozpustnej látky	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
približná rozpustnosť v g/l	> 1 000	1 000 – 200	200 – 100	100 – 50	50 – 10	10 – 1	< 1

Metóda vypierania z kolóny

Princíp

9. Táto metóda je založená na vypieraní testovanej látky vodou z mikrokolóny, ktorá je naplnená inertným nosným materiálom, ktorý sa predtým pokryl nadbytkom testovanej látky (2). Rozpustnosť vo vode je daná hmotnostnou koncentráciou eluátu, keď dosiahne rovnovážny stav, v závislosti od času.

Vybavenie

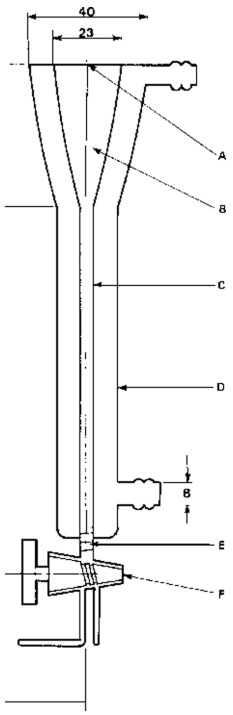
10. Vybavenie pozostáva z mikrokolóny (obrázok 1), ktorá sa udržiava pri konštantnej teplote. Je spojené buď s recirkulačným čerpadlom (obrázok 2), alebo s egalizačnou nádobou (obrázok 3). Mikrokolóna obsahuje inertný nosný materiál, ktorý na mieste drží malá zátka zo sklenej vaty, ktorá slúži aj na filtrovanie častíc. Medzi materiál, ktorý je možné použiť ako nosný, patria sklené guľôčky, diatomit alebo iný inertný materiál.

11. Mikrokolóna znázornená na obrázku 1 je vhodná na zostrojenie vybavenia s recirkulačných čerpadlom. Má uzavretý priestor nad kvapalinou („head space“) poskytujúci päť úložných objemov (vypustených na začiatku pokusu) a objem piatich vzoriek (odobratých na analýzu v priebehu pokusu). Veľkosť je možné prípadne znížiť, ak možno do systému v priebehu pokusu pridať vodu ako náhradu za pôvodných päť úložných objemov vypustených zo systému spolu s prímesami. Kolóna je napojená na rúrku vyrobenú z inertného materiálu, ktorá predstavuje recirkulačné čerpadlo schopné napumpovať približne 25 ml/h. Recirkulačné čerpadlo môže byť napríklad peristaltické alebo membránové čerpadlo. Musí sa dbať na to, aby nedošlo ku kontaminácii a/alebo adsorpcii materiálom, z ktorého sú zhotovené rúrky.

12. Schematická zostava s využitím egalizačnej nádoby je znázornená na obrázku 3. V tejto zostave je mikrokolóna vybavená jednocestným uzatváracím ventilom. Spojenie s egalizačnou nádobou tvorí zabrúsená sklenená spojka a rúrka vyrobená z inertného materiálu. Prietok z egalizačnej nádoby by mal byť približne 25 ml/h.

▼**M4**

Obrázok 1



Rozmery v mm

A. Prípojka pre zabrúsenú sklenenú spojku

B. Uzavretý priestor nad kvapalinou

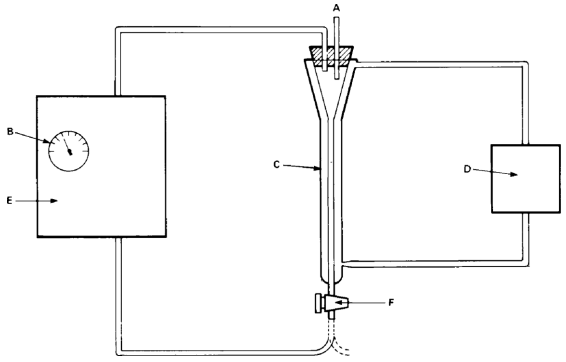
C. Vnútorná časť 5

D. Vonkajšia časť 19

E. Zátka zo sklenej vaty

F. Uzatvárací ventil

Obrázok 2



A. Vyrovnávanie tlaku vzduchom

B. Prietokomer

C. Mikrokolóna

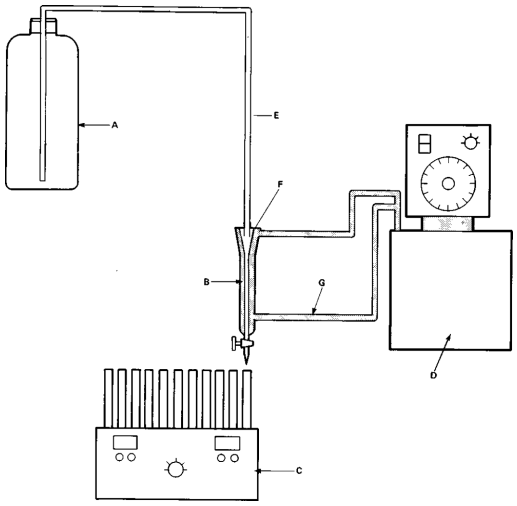
D. Termostaticky kontrolované cirkulačné čerpadlo

E. Recirkulačné čerpadlo

F. Dvojcestný ventil pre vzorkovanie

▼M4

Obrázok 3



A. Egalizačná nádoba (napr. 2,5-litrová chemická banka)

B. Kolóna

C. Frakčný akumulátor

D. Termostat

E. Teflónová rúrka

F. Zabrúsená sklenená spojka

G. Vodné potrubie (medzi termostatom a kolónou, s vnútorným priemerom približne 8 mm)

13. Približne 600 mg nosného materiálu sa premiestni do 50 ml banky s guľatým dnom. Vhodné množstvo testovanej látky sa rozpustí v prchavom rozpúšťadle s analytickou kvalitou reagentov a primerané množstvo tohto roztoku sa pridá do nosného materiálu. Rozpúšťadlo sa úplne odparí, napr. pomocou rotačnej odparky, lebo inak sa v priebehu vypierania nedosiahne nasýtenie nosiča vodou z dôvodu rozkladu na povrchu. Nosný materiál s aplikovanou látkou sa nechá máčať približne v 5 ml vody dve hodiny a suspenzia sa vleje do mikrokolóny. Suchý nosný materiál sa prípadne môže vliať do mikrokolóny naplnenej vodou a nechať vyvažovať dve hodiny.

14. Aplikácia testovanej látky na nosný materiál môže spôsobovať problémy, ktoré budú viesť k chybným výsledkom, napr. ak sa testovaná látka nanáša ako olej. Tieto problémy treba preskúmať a v správe o teste uviesť podrobnosti.

Postup s využitím recirkulačného čerpadla

15. Spustí sa prúdenie cez kolónu. Odporúča sa použiť prietok približne 25 ml/h, ktorý v prípade opísanej kolóny zodpovedá desiatim úložným objemom/h. Najmenej prvých päť úložných objemov sa vypustí s cieľom odstrániť prímesi rozpustné vo vode. Potom sa čerpadlo nechá bežať až dovtedy, kým sa nedosiahne rovnováha vymedzená piatimi za sebou nasledujúcimi vzorkami, ktorých koncentrácie sa nelíšia viac ako ± 30 % v náhodnom slede. Vzorky by mali byť od seba oddelené časovými intervalmi zodpovedajúcimi prietoku najmenej desať úložných objemov. V závislosti od použitej analytickej metódy môže byť vhodnejšie zostrojiť krivku koncentrácia/čas, aby sa ukázalo, že bola dosiahnutá rovnováha.

▼M4

Postup s využitím egalizačnej nádoby

16. Za sebou nasledujúce eluátové frakcie by sa potom mali zachytávať a analyzovať podľa zvolenej metódy. Frakcie zo stredného eluátového rozsahu, v ktorých sú koncentrácie konštantné v rozsahu ± 30 % minimálne v piatich následných frakciách, sa použijú na stanovenie rozpustnosti.

17. Ako eluent sa uprednostňuje dvakrát destilovaná voda. Takisto možno použiť aj deionizovanú vodu s odporom vyšším ako 10 megaohmov/cm a celkovým obsahom organického uhlíka nižším ako 0,01 %.

18. V prípade oboch postupov sa druhé kolo merania vykonáva pri polovičnej miere prvého prietoku. Ak sú výsledky oboch kôl meraní súhlasné, test bol uskutočnený na uspokojivej úrovni. Ak je nameraná rozpustnosť pri nižšom prietoku vyššia, znižovanie miery prietoku na polovicu musí pokračovať dovtedy, kým dve za sebou nasledujúce kolá meraní nevykážu rovnakú rozpustnosť.

19. V obidvoch prípadoch by sa frakcie mali kontrolovať z hľadiska prítomnosti koloidného materiálu skúmaním Tyndallovho efektu. Prítomnosť čiastočiek znehodnocuje výsledky a test sa musí zopakovať po zdokonalení postupu filtrácie v kolóne.

20. Hodnota pH každej vzorky sa musí zmerať podľa možnosti pomocou špeciálnych indikačných pásikov.

Banková metóda

Princíp

21. Testovaná látka (tuhé látky musia byť rozomleté na prach) sa rozpustí vo vode pri teplote o niečo vyššej, ako je testovacia teplota. Keď sa dosiahne nasýtenie, zmes sa ochladí a udržiava sa pri testovacej teplote. Meranie sa môže alternatívne uskutočniť priamo pri testovacej teplote, ak sa vhodným vzorkovaním zabezpečí, že sa dosiahne nasýtený rovnovážny stav. Následne sa hmotnostná koncentrácia testovanej látky vo vodnom roztoku, ktorý nesmie obsahovať žiadne nerozpustené častice, stanoví vhodnou analytickou metódou (3).

Vybavenie

22. Je potrebný tento materiál:

— normálne laboratórne sklené nádoby a vybavenie laboratórnymi prístrojmi,

— zariadenie na premiešavanie, resp. pretrepávanie, roztokov pri kontrolovanej a regulovanej konštantnej teplote,

— odstredivka (podľa možnosti termostatovaná), ak sa požaduje pri emulziách, a

— analytické vybavenie.

Postup

23. Množstvo testovanej látky potrebnej na nasýtenie želaného objemu vody sa odhaduje z predbežného testu. Približne päťnásobok stanoveného množstva sa odváži do každej z troch sklených nádob vybavených sklenými zátkami (napr. do odstredivkových skúmaviek, sklených baniek). Do každej nádoby sa pridá objem vody zvolený podľa analytickej metódy a rozsahu rozpustnosti. Potom sa nádoby tesne uzavrú a nechajú sa premiešavať pri teplote 30 °C. Odporúča sa použiť trepačku alebo miešačku schopnú fungovať pri konštantnej teplote, napr. magnetické miešadlo v termostatickom vodnom kúpeli. Po uplynutí jedného dňa sa jedna z nádob ďalších 24 hodín opätovne vyváži pri skúšobnej teplote s občasným pretrepaním. Obsah nádoby sa

▼M4

odstredí pri skúšobnej teplote a pomocou vhodnej analytickej metódy sa stanoví koncentrácia testovanej látky v čírej vodnej fáze. So zvyšnými dvoma bankami sa naloží podobne po počiatočnom vyvážení pri teplote 30 °C počas dvoch dní v prípade jednej a počas troch dní v prípade druhej. Ak sa namerané koncentrácie aspoň v dvoch posledných nádobách nelíšia o viac ako 15 %, test bol uskutočnený na uspokojivej úrovni. Ak výsledky z nádob 1, 2 a 3 prejavia tendenciu narastajúcich hodnôt, celý test sa musí zopakovať pri použití dlhších vyvažovacích časov.

24. Test sa môže uskutočniť aj bez predchádzajúcej inkubácie pri teplote 30 °C. Na účely odhadu rýchlosti vzniku saturačnej rovnováhy sa vzorky odoberú, až keď už čas miešania neovplyvňuje merané koncentrácie.

25. Hodnota pH každej vzorky sa musí zmerať podľa možnosti pomocou špeciálnych indikačných pásikov.

Analytické stanovenie

26. Odporúča sa použiť špecifickú metódu pre príslušnú testovanú látku, lebo malé množstvá rozpustných prímesí môžu spôsobiť veľké chyby v nameranej rozpustnosti. Príkladmi takýchto metód sú plynová alebo kvapalinová chromatografia, titrácia, fotometria alebo voltametria.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

Metóda vypierania z kolóny

27. Pre každé kolo sa musí vypočítať stredná hodnota a smerodajná odchýlka namerané najmenej pri piatich po sebe nasledujúcich vzorkách zo saturačnej úrovne. Stredné hodnoty získané z dvoch testov s rôznym prietokom by sa nemali líšiť o viac ako 30 %.

Banková metóda

28. Jednotlivé výsledky z každej z troch baniek, ktoré sa nesmú líšiť o viac ako 15 %, sa spriemerujú.

Správa o teste

Metóda vypierania z kolóny

29. Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

— výsledky predbežného testu,

— chemická identita a prímesi (opatrenia v rámci predbežnej purifikácie, ak boli uskutočnené),

— koncentrácie, prietoky a pH pre každú vzorku,

— stredné hodnoty a smerodajné odchýlky namerané najmenej pri piatich vzorkách zo saturačnej úrovne každého kola meraní,

— priemer dvoch za sebou nasledujúcich kôl meraní,

— teplota vody počas saturačného procesu,

— metóda analýzy,

— charakteristické vlastnosti nosného materiálu,

— spôsob aplikácie testovanej látky na nosný materiál,

— druh použitého riedidla,

— dôkazy akejkoľvek chemickej nestálosti látky počas testu,

— všetky informácie dôležité pre interpretáciu výsledkov, najmä týkajúce sa prímesí a fyzikálneho skupenstva (stavu) testovanej látky.

▼**M4**

Banková metóda

30. Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

— výsledky predbežného testu,

— chemická identita a prímesi (opatrenia v rámci predbežnej purifikácie, ak boli uskutočnené),

— samostatné analytické stanovenia hodnôt a ich priemer v prípadoch, kde boli pre každú banku stanovené viaceré hodnoty,

— pH každej vzorky,

— priemer hodnôt pre rozdielne banky, pri ktorých sa dosiahla súhlasnosť výsledkov,

— testovacia teplota,

— analytická metóda,

— dôkazy akejkoľvek chemickej nestálosti látky počas testu,

— všetky informácie dôležité na interpretáciu výsledkov, najmä týkajúce sa prímesí a fyzikálneho skupenstva (stavu) testovanej látky.

LITERATÚRA

1. Smernica Komisie 92/69/EHS z 31. júla 1992, ktorou sa po sedemnástykrát prispôsobuje technickému pokroku smernica Rady 67/548/EHS o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení týkajúcich sa klasifikácie, balenia a označovania nebezpečných látok (Ú. v. ES L 383, 29.12.1992, s. 113).

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

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

▼B

A.8. ROZDEĽOVACÍ KOEFICIENT

1. METÓDA

Opísaná metóda „trepačkovej banky“ je upravená smernicou na vykonávanie testov OECD (1).

1.1. ÚVOD

Na účely realizácie tejto metódy sa odporúča získať predbežné informácie o štruktúrnom vzorci, disociačnej konštante, rozpustnosti vo vode, hydrolýze, rozpustnosti v n-oktanole a povrchovom napätí látky určenej na testovanie.

Merania na ionizovateľných testovaných látkach by sa mali realizovať iba v ich neionizovanej forme (voľná kyselina alebo voľná zásada) dosiahnutej použitím vhodného tlmivého roztoku s hodnotou pH minimálne o jednu jednotku pH pod (voľná kyselina) alebo nad (voľná zásada) hodnotou pH.

Táto testovacia metóda pozostáva z dvoch samostatných postupov: z metódy trepačkovej banky a vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC). Prvý z uvedených postupov sa dá aplikovať, keď hodnota log P_{ow} patrí do rozsahu od – 2 do 4, a druhý, keď táto hodnota patrí do rozsahu od 0 do 6. Pred uskutočnením ktoréhokoľvek z uvedených postupov je potrebné najprv získať predbežný odhad rozdeľovacieho koeficientu.

Metóda trepačkovej banky sa dá použiť iba v prípade absolútne čistých testovaných látok rozpustných vo vode a n-oktanole. Nemožno ju uplatniť v prípade povrchovo aktívnych látok (pre ktoré treba zabezpečiť vypočítanú hodnotu alebo odhad založený na rozpustnosti vo vode a n-oktanole).

Metóda vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) sa nedá použiť v prípade silných kyselín a zásad, polymetalických látok, povrchovo aktívnych látok alebo látok, ktoré reagujú s eluentom. Pre tieto materiály treba zabezpečiť vypočítanú hodnotu alebo odhad založený na rozpustnosti vo vode a n-oktanole.

Metóda vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) je menej citlivá na prítomnosť prímesí v testovanej látke alebo prípravku než metóda trepačkovej banky. Napriek tomu však prímesi v niektorých prípadoch môžu značne skomplikovať interpretáciu výsledkov, pretože vrcholová špecifikácia sa stáva neistou. Pre zmesi, ktoré vykazujú nerozpustené pásmo, treba určiť vrchné a spodné medzné hodnoty log P.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Rozdeľovací koeficient (P) je definovaný ako pomer rovnovážnych koncentrácií (c_i) rozpustenej látky v dvojfázovom systéme pozostávajúcom z dvoch do značnej miery nezmiešateľných rozpúšťadiel. V prípade n-oktanolu a vody platí:

$$P_{ow} = \frac{c_{n-oktan-1-ol}}{c_{voda}}$$

Rozdeľovací koeficient (P) je preto kvocientom dvoch koncentrácií a udáva sa vo forme dekadického logaritmu (log P).

▼B

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Metóda trepačkovej banky

Referenčné látky sa nemusia použiť vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová látka. V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

Metóda HPLC

Na účely korelácie nameraných údajov HPLC (vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie) príslušnej zlúčeniny s jej hodnotou P treba zostrojiť kalibračný graf údajov log P verzus chromatografické údaje s použitím najmenej 6 referenčných bodov. Zostáva na užívateľovi, aby si zvolil príslušné vhodné referenčné látky. Vždy keď je to možné, najmenej jedna referenčná látka má mať hodnotu P_{ow} vyššiu než testovaná látka a iná zasa hodnotu P_{ow} nižšiu než testovaná látka. Pre hodnoty log P nižšie ako 4 môže byť kalibrácia založená na údajoch nadobudnutých v rámci metódy trepačkovej banky. Pre hodnoty log P vyššie ako 4 môže byť kalibrácia založená na literárnych údajoch s potvrdenou platnosťou, ak tieto súhlasia s vypočítanými hodnotami. Pre väčšiu presnosť sa odporúča radšej vybrať také referenčné látky, ktoré majú podobnú štruktúru ako príslušná testovaná látka.

Existujú obsiahle zoznamy hodnôt log P_{ow} pre mnohé skupiny chemických látok a prípravkov (2) (3). Ak údaje týkajúce sa rozdeľovacích koeficientov štrukturálne príbuzných látok nie sú dostupné, možno použiť všeobecnejšiu kalibráciu uskutočnenú s inými referenčnými látkami.

Zoznam odporúčaných referenčných látok a ich hodnoty P_{ow} sú uvedené v dodatku 2.

1.4. PRINCÍP METÓDY

1.4.1. **Metóda trepačkovej banky**

Na účely stanovenia rozdeľovacieho koeficientu musí byť dosiahnutá rovnováha medzi všetkými vzájomne pôsobiacimi zložkami systému a musia byť stanovené koncentrácie látok rozpustených v dvoch fázach. Štúdium odbornej literatúry týkajúcej sa tejto otázky ukazuje, že na vyriešenie problému dôkladného premiešania dvoch fáz s ich následnou separáciou na účely stanovenia rovnovážnej koncentrácie pre testovanú látku možno použiť viacero odlišných technických postupov.

1.4.2. **Metóda HPLC (vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie)**

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia sa uskutočňuje na analytických kolónach naplnených komerčne dostupnou tuhou fázou obsahujúcou dlhé uhľovodíkové reťazce (napr. C_8, C_{18}), ktoré sú chemicky viazané na kremík. Látky injektované na takúto kolónu sa pohybujú pozdĺž nej rozdielnymi rýchlosťami, pretože dochádza k rozdielnym stupňom rozdeľovania medzi pohyblivú fázu a uhľovodíkovú nepohyblivú fázu. Zmesi látok sa vypierajú v poradí za sebou v závislosti od ich hydrofóbnosti, pričom látky rozpustné vo vode sa vypierajú ako prvé a látky rozpustné v oleji ako posledné, proporcionálne k ich rozdeľovaciemu koeficientu medzi uhľovodíkom a vodou. Toto umožňuje vytvorenie vzájomného vzťahu medzi dobou zdržania na takejto kolóne s reverznou fázou a rozdeľovacím koeficientom n-oktanol/voda. Rozdeľovací koeficient je odvodený z činiteľa využitia (kapacitného faktora) k, daného výrazom:

▼B

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

v ktorom t_r = doba zdržania (retencie) testovanej látky a t_o = priemerný čas, ktorý potrebuje molekula rozpúšťadla na to, aby prešla kolónou (nečinná doba).

Kvantitatívne analytické metódy sa nepožadujú a potrebné je iba stanovenie časov vypierania.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

1.5.1. **Opakovateľnosť**

Metóda trepačkovej banky

Na účely zaistenia presnosti rozdeľovacieho koeficientu je potrebné vykonať duplikátne stanovenia za troch odlišných skúšobných podmienok, pričom možno meniť množstvo špecifikovanej látky, ako aj pomer objemov rozpúšťadiel. Stanovené hodnoty rozdeľovacieho koeficientu vyjadrené ako ich dekadické (Briggsove) logaritmy musia patriť do rozsahu ± 0,3 log jednotiek.

Metóda HPLC (vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie)

Na účely zvýšenia dôveryhodnosti merania sa musia uskutočniť duplikátne stanovenia. Hodnoty log P odvodené z jednotlivých meraní musia patriť do rozsahu ± 0,1 log jednotiek.

1.5.2. **Citlivosť**

Metóda trepačkovej banky

Rozsah merania v rámci tejto metódy je určovaný možnosťou sledovania analytického postupu. Toto by malo umožniť stanovenie hodnôt log P_{ow} v rozmedzí od – 2 do 4 (príležitostne, keď sú na to podmienky, toto rozmedzie môže byť rozšírené na log P_{ow} s hodnotou až 5), keď koncentrácia rozpustenej látky ani v jednej fáze nepresiahne hodnotu 0,01 mol na jeden liter.

Metóda HPLC (vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie)

Metóda vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie umožňuje odhadovanie rozdeľovacích koeficientov v rozmedzí log P_{ow} od 0 do 6.

Za normálnych okolností možno rozdeľovací koeficient látky alebo prípravku odhadnúť s presnosťou na ± 1 log jednotku hodnoty v rámci metódy trepačkovej banky. Typické korelácie možno nájsť v odkazoch (4) (5) (6) (7) (8). Vyššia presnosť sa môže zvyčajne dosiahnuť vtedy, keď sú korelačné diagramy založené na štruktúrne príbuzných referenčných látkach (9).

▼B

1.5.3. **Špecifickosť**

Metóda trepačkovej banky

Nernstov rozdeľovací zákon sa dá použiť iba pri konštantnej teplote, tlaku a hodnote pH pre zriedené roztoky. Uplatňuje sa výlučne pre čisté látky dispergované medzi dve čisté riedidlá. Ak sa v tom istom čase objavia v jednej alebo obidvoch fázach viaceré odlišné rozpustené látky, môže to nepriaznivo ovplyvniť výsledky.

Disociácia alebo spájanie rozpustených molekúl má za následok odchýlky od Nernstovho rozdeľovacieho zákona. Takéto odchýlky sú naznačované skutočnosťou, že rozdeľovací koeficient sa stane závislý od koncentrácie roztoku.

Kvôli viacnásobným rovnovážnym stavom by sa táto testovacia metóda nemala aplikovať na ionizovateľné prípravky bez uplatnenia korekcie. V prípade takýchto prípravkov by sa malo uvažovať o použití tlmivých roztokov namiesto vody, pričom hodnota pH tlmivého roztoku by mala predstavovať minimálne jednu jednotku pH z pKa testovanej látky, a zároveň treba mať na pamäti závažnosť tejto hodnoty pH pre životné prostredie.

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Predbežný odhad rozdeľovacieho koeficientu**

Uprednostňuje sa odhad rozdeľovacieho koeficientu použitím výpočtovej metódy (dodatok 1) alebo, kde je to vhodné, z pomeru rozpustností testovanej látky v čistých rozpúšťadlách (10).

1.6.2. **Metóda trepačkovej banky**

1.6.2.1. *Príprava*

n-oktanol: stanovenie rozdeľovacieho koeficientu by sa malo uskutočniť s reagentom analytickej triedy vysokej čistoty.

Voda: použije sa voda destilovaná alebo dvakrát destilovaná v sklenom alebo kremennom destilačnom prístroji. V zdôvodnených prípadoch treba na ionizovateľné prípravky namiesto vody použiť tlmivé roztoky.

Upozornenie:

Nesmie sa používať voda odoberaná priamo z ionexu (vymieňača iónov).

1.6.2.1.1. Predsaturácia rozpúšťadiel

Predtým než sa stanoví rozdeľovací koeficient, fázy rozpúšťadlového systému sa vzájomne nasýtia trepaním pri teplote pokusu. Na tento účel je praktické pretrepávať dve veľké a vysoké fľaše s n-oktanolom analytickej triedy vysokej čistoty alebo s vodou, pričom každá musí obsahovať dostatočné množstvo druhého rozpúšťadla, počas 24 hodín na mechanickej trepačke a potom sa nechajú odstáť dostatočne dlhý čas na to, aby sa fázy od seba oddelili a aby sa dosiahol stav saturácie.

▼B

1.6.2.1.2. Príprava na test

Celý objem sústavy dvoch fáz by mal skoro úplne naplniť testovaciu nádobu. Toto pomôže zabrániť stratám materiálu následkom vyprchávania. Objemový pomer a množstvá látky, ktoré sa majú použiť, sú stanovené týmto:

— predbežným odhadom rozdeľovacieho koeficientu (pozri vyššie),

— minimálnym množstvom testovanej látky potrebným pre analytický postup a

— obmedzením maximálnej koncentrácie v každej fáze na 0,01 mol na liter.

Uskutočňujú sa tri testy. V prvom teste sa použije vypočítaný objemový pomer n-oktanolu k vode; v druhom teste sa tento pomer vydelí dvoma; a v treťom teste sa tento pomer vynásobí dvoma (napr. 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Testovaná látka

V n-oktanole predsaturovanom vodou sa pripraví základný zásobný roztok. Koncentrácia tohto základného zásobného roztoku musí byť presne stanovená ešte predtým, než sa použije na stanovenie rozdeľovacieho koeficientu. Tento roztok by mal byť uskladnený v takých podmienkach, ktoré zaručia jeho stabilitu.

1.6.2.2. *Podmienky skúšania*

Testovacia teplota sa musí udržiavať na konštantnej úrovni (± 1 °C) a musí byť v rozmedzí od 20 °C do 25 °C.

1.6.2.3. *Postup merania*

1.6.2.3.1. Vytvorenie rozdeľovacej rovnováhy

Pre každú zo skúšobných podmienok treba pripraviť duplikátne skúšobné nádoby obsahujúce požadované, presne odmerané množstvá dvoch rozpúšťadiel spolu s potrebným množstvom základného zásobného roztoku.

Fázy n-oktanolu (n-oktanolové fázy) sa musia merať podľa objemu. Skúšobné nádoby treba buď umiestniť na vhodnú trepačku, alebo ich pretrepávať ručne. V prípade použitia odstredivkovej skúmavky spočíva odporúčaná metóda v rýchlom obracaní skúmavky o 180 stupňov okolo jej priečnej osi tak, aby všetok zachytený vzduch vystúpil cez obidve fázy. Skúsenosti ukázali, že na vytvorenie rozdeľovacej rovnováhy zvyčajne postačí 50 takýchto obratov. Na zabezpečenie želaného výsledku sa odporúča 100 obratov v priebehu piatich minút.

1.6.2.3.2. Oddeľovanie fáz odstreďovaním

Keď je to potrebné, na účely oddelenia fáz by malo byť výkonané odstredenie zmesi. Tento úkon by sa mal uskutočniť v laboratórnej odstredivke s udržiavanou stálou teplotou miestnosti alebo v prípade, ak sa použije odstredivka bez tepelnej regulácie, odstredivkové skúmavky by mali byť ponechané pri skúšobnej teplote počas najmenej jednej hodiny pred začatím analýzy.

▼B

1.6.2.4. *Analýza*

Na stanovenie rozdeľovacieho koeficientu je potrebné stanoviť koncentrácie testovanej látky v obidvoch fázach. Toto možno uskutočniť odobratím alikvotnej časti oboch fáz z každej skúmavky pre každú zo skúšobných podmienok a ich analyzovaním zvoleným postupom. Celkové množstvo látky prítomné v oboch fázach treba vypočítať a porovnať s množstvom látky, ktoré sa pôvodne použilo.

Vodná fáza by sa mala vzorkovať takým postupom, ktorý by minimalizoval riziko prítomnosti stopových množstiev n-oktanolu: na odber vzorky z vodnej fázy sa môže použiť sklená injekčná striekačka s oddeliteľnou ihlou. Injekčná striekačka by mala byť spočiatku čiastočne naplnená vzduchom. Počas prenikania ihly cez vrstvu n-oktanolu treba mierne vypudzovať vzduch z injekčnej striekačky. Potom sa do striekačky naberie primeraný objem vodnej fázy. Striekačka sa rýchlym pohybom vytiahne z roztoku a ihla sa odstráni. Obsah striekačky potom možno použiť ako vodnú vzorku. Koncentrácia v oboch odstredením oddelených fázach by sa podľa možnosti mala stanoviť metódou špecifickou pre príslušnú testovanú látku. Príklady analytických metód, ktoré tu možno použiť, sú:

— fotometrické metódy,

— plynová chromatografia,

— vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC).

1.6.3. **Metóda HPLC (vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie)**

1.6.3.1. *Príprava*

Prístroje

Požaduje sa kvapalinový chromatograf vybavený impulzovým čerpadlom a vhodným zariadením na detekciu. Odporúča sa použitie vstrekovacieho ventilu so vstrekovacími slučkami. Prítomnosť polárnych skupín v nepohyblivej fáze môže vážne narušiť fungovanie kolóny vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie. Z toho dôvodu by mali stacionárne fázy obsahovať minimálne percento polárnych skupín (11). Možno použiť aj komerčné mikročasticové náplne so spätnou fázou alebo kolóny s hotovou náplňou. Medzi vstrekovací systém a analytickú kolónu sa môže umiestniť ochranná kolóna.

Pohyblivá fáza

Na prípravu eluačného rozpúšťadla, ktoré treba pred použitím odplyniť, sa použije metanol kvalitatívnej triedy HPLC a voda kvalitatívnej triedy HPLC. Treba použiť izokratické vypieranie. Ďalej treba použiť pomery metanolu a vody s minimálnym obsahom vody 25 %. Na vypieranie prípravkov s hodnotou log P 6 v priebehu jednej hodiny pri prietoku 1 ml za minútu postačí typický pomer zmesi metanolu a vody 3:1 (v/v). Pre prípravky s vysokým log P môže byť potrebné skrátiť čas vypierania (ako aj časy referenčných látok) znížením polarity pohyblivej fázy alebo skrátením dĺžky kolóny.

Látky s veľmi nízkou rozpustnosťou v n-oktanole majú pri použití metódy vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie tendenciu vykazovať abnormálne nízke hodnoty log P_{ow}, pričom zóny takýchto prípravkov sa niekedy spájajú s čelom rozpúšťadla. Toto pravdepodobne vyplýva zo skutočnosti, že rozdeľovací proces je príliš pomalý na to, aby dosiahol rovnovážny stav v čase potrebnom za normálnych okolností v rámci separácie metódou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie. Na dosiahnutie spoľahlivej hodnoty môže byť potom účinné zníženie prietoku, resp. zmenšenie pomeru metanolu a vody.

▼B

Testované a referenčné látky by mali byť rozpustné v pohyblivej fáze v dostatočných koncentráciách, aby sa umožnila ich detekcia. Iba vo výnimočných prípadoch sa môžu so zmesou metanolu a vody použiť aj aditíva, pretože tieto menia vlastnosti kolóny. V prípade chromatografov s aditívami je povinné použiť samostatnú kolónu toho istého typu. Ak zmes metanolu a vody nie je vhodná, môžu sa použiť iné zmesi organického rozpúšťadla a vody, napr. zmes etanolu a vody alebo acetonitrilu (nitrilu kyseliny etánovej) a vody.

Hodnota pH eluentu je kritická pre ionizovateľné látky. Tieto hodnoty musia patriť do operačného rozmedzia pH kolóny, ktoré leží zvyčajne medzi hodnotami 2 až 8. Odporúča sa pufrovanie. Treba dbať na to, aby sa zabránilo zrážaniu solí a poškodeniu kolóny, ku ktorým dochádza v prípade použitia niektorých organických zmesí fázy a pufra. Merania metódou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) s nepohyblivými fázami na báze kremíka s hodnotami pH nad 8 sa neodporúčajú, pretože použitie alkalickej pohyblivej fázy môže zapríčiniť rýchle poškodenie funkčnosti kolóny.

Rozpustené látky

Referenčné látky sa musia vyznačovať maximálnou možnou čistotou. Ak je to možné, látky alebo prípravky určené na použitie v rámci testu alebo kalibrácie sú rozpustené v pohyblivej fáze.

Podmienky skúšania

Teplota počas merania by sa nemala meniť v rozsahu väčšom ako ± 2 K (kelvin).

1.6.3.2. **Meranie**

Výpočet nečinnej doby t_0

Nečinná doba t_0 môže byť stanovená použitím buď homologického radu (napr. n-alkylmetylových ketónov), alebo nezadržaných, resp. neeluovaných, organických látok alebo prípravkov (napr. tiomočoviny alebo formamidu, amidu kyseliny metánovej). Na výpočet nečinnej doby t_0 s použitím homologického radu sa injektuje najmenej sedem členov homologického radu a stanovia sa príslušné doby zdržania. Prvotné (nespracované) doby zdržania $t_{r(n_c + 1}$ sú graficky znázornené v diagrame ako funkcia $t_{r(n_c)}$ a stanovený je úsek a a sklon b regresnej rovnice:

$$t_{r(n_c + 1)} = a + b\ t_{r(n_c)}$$

(kde n_c = počet atómov uhlíka). Nečinná doba t_0 je potom daná vzťahom:

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

▼B

Kalibračný graf

Ďalším krokom postupu je zostrojenie korelačného diagramu hodnôt log k verzus log P pre príslušné referenčné látky. V praktickom postupe sa súčasne vstrekne súbor piatich až desiatich štandardných referenčných látok, ktorých hodnota log P sa nachádza v blízkosti predpokladaného rozmedzia, a stanovia sa doby zdržania, podľa možnosti na záznamovej integračnej jednotke napojenej na detekčný systém. Zodpovedajúce logaritmy kapacitných faktorov log k sa vypočítajú a nanesú do diagramu ako funkcia log P stanovenou metódou trepačkovej banky. Kalibrácia sa uskutočňuje v pravidelných časových intervaloch, a to najmenej raz denne, aby sa tak dali vziať do úvahy možné zmeny v činnosti kolóny.

Stanovenie kapacitného faktora testovanej látky

Testovaná látka sa vstrekne do čo najmenšieho možného množstva mobilnej fázy. Stanoví sa (duplikátne) doba zdržania, čo umožní výpočet kapacitného faktora k. Z korelačného grafu referenčných látok sa dá interpolovať rozdeľovací koeficient testovanej látky. Pre veľmi nízke a veľmi vysoké rozdeľovacie koeficienty je potrebná extrapolácia. V takýchto prípadoch treba dávať mimoriadny pozor na hranice významnosti regresnej čiary.

2. **ÚDAJE**

Metóda trepačkovej banky

Spoľahlivosť stanovených hodnôt P sa môže overiť porovnaním stredných hodnôt duplikátnych stanovení s celkovou strednou hodnotou.

3. **SPRÁVA**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

— presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímesi),

— keď sa dané metódy nedajú uplatniť (napr. povrchovo aktívny materiál), treba zabezpečiť vypočítanú hodnotu alebo odhad založený na jednotlivých rozpustnostiach v n-oktanole a vo vode,

— všetky informácie a poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov testu, najmä týkajúce sa prímesí a fyzikálneho skupenstva (stavu) testovanej látky.

V prípade metódy trepačkovej banky:

— výsledok predbežného odhadu, ak sa takýto uskutočnil,

— teplotu, pri ktorej sa hodnoty stanovovali,

— údaje o analytických postupoch uplatnených pri stanovovaní koncentrácií,

— čas a rýchlosť odstreďovania, ak sa použilo,

▼B

— namerané koncentrácie v obidvoch fázach pre každé stanovenie (to znamená, že dohromady sa uvedú hodnoty 12 koncentrácií),

— hmotnosť testovanej látky, objem každej fázy použitý v každej skúšobnej nádobe a celkové vypočítané množstvo testovanej látky prítomné v každej fáze po vyvážení (po dosiahnutí rovnovážneho stavu),

— vypočítané hodnoty rozdeľovacieho koeficientu (P) a stredná hodnota musia byť uvedené pre každú sériu skúšobných podmienok, ako aj stredné hodnoty pre všetky stanovenia. Ak existujú náznaky závislosti rozdeľovacieho koeficientu od koncentrácie, táto skutočnosť sa musí taktiež uviesť v správe,

— v správe sa musí uviesť smerodajná odchýlka jednotlivých hodnôt P od ich strednej hodnoty,

— stredná hodnota P zo všetkých stanovení sa musí tiež vyjadriť ako jej logaritmus (základ 10),

— vypočítanú teoretickú hodnotu P_{ow}, keď bola táto hodnota stanovená alebo keď je nameraná hodnota > ako 10^4,

— hodnotu pH použitej vody a vodnej fázy počas pokusu,

— ak boli použité tlmivé roztoky, tak zdôvodnenie použitia tlmivých roztokov namiesto vody, ďalej zloženie, koncentráciu a hodnoty pH tlmivých roztokov, hodnotu pH vodnej fázy pred uskutočnením pokusu a po jeho ukončení.

V prípade metódy HPLC (vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie):

— výsledok predbežného odhadu, ak sa takýto uskutočnil,

— testované a referenčné látky a ich čistotu,

— teplotné rozmedzie jednotlivých stanovení,

— hodnoty pH, pri ktorých sa stanovenia vykonali,

— podrobnosti o analytickej a ochrannej kolóne, pohyblivej (mobilnej) fáze a detekčných prostriedkoch,

— retenčné údaje a hodnoty log P z odbornej literatúry pre referenčné látky použité v rámci kalibrácie,

— podrobnosti o zodpovedajúcej regresnej čiare (log k verzus log P),

— priemerné retenčné údaje a interpolovanú hodnotu P pre testovanú látku alebo prípravok,

— opis zariadenia a prevádzkových, resp. pracovných, podmienok,

— eluačné profily,

— množstvá testovaných a referenčných látok zavedených do kolóny,

— nečinnú dobu a spôsob, akým sa merala.

▼B

4. **ODKAZY**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼B

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

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

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

▼B

Dodatok 1

Výpočtové/odhadové metódy

ÚVOD

Všeobecný úvod k výpočtovým metódam, údaje a príklady sú uvedené v publikácii Handbook of Chemical Property Estimation Methods (a).

Vypočítané hodnoty P_{ow} sa môžu použiť týmito spôsobmi:

— na rozhodnutie o tom, ktorá z experimentálnych metód je vhodná (rozmedzie pri metóde trepačkovej banky: log P_{Ow}: – 2 až 4, rozmedzie pri metóde HPLC: log P_{Ow}: 0 až 6),

— na voľbu vhodných testových podmienok (napr. referenčných látok pre postupy HPLC, objemového pomeru n-oktanolu a vody pre metódu trepačkovej banky),

— ako laboratórna vnútorná (interná) kontrola z hľadiska výskytu možných chýb v pokusoch,

— na umožnenie odhadu hodnôt P_{ow} v prípadoch, kde sa nemôžu použiť experimentálne metódy z technických dôvodov.

ODHADOVÁ METÓDA

Predbežný odhad rozdeľovacieho koeficientu

Hodnota rozdeľovacieho koeficientu sa môže odhadnúť použitím rozpustností testovanej látky v čistých rozpúšťadlách:

$$P_{odhad} = \frac{\text{nasýtenie } c_{n\,-\,octanol}}{\text{nasýtenie } c_{voda}}$$

VÝPOČTOVÉ METÓDY

Princíp výpočtových metód

Všetky výpočtové metódy sú založené na formálnom trieštení molekuly na vhodné subštruktúry, pre ktoré sú známe spoľahlivé prírastky hodnoty log P_{ow}. Hodnota log P_{ow} celej molekuly sa potom vypočíta ako súčet jej zodpovedajúcich čiastkových hodnôt plus súčet korekčných členov pre vnútromolekulové interakcie.

Zoznamy fragmentových konštánt a korekčných členov sú uvedené v odkazoch (b) (c) (d) (e). Niektoré z nich sa pravidelne aktualizujú (b).

Kritériá kvality

Spoľahlivosť výpočtovej metódy vo všeobecnosti klesá s narastajúcou komplexnosťou skúmanej látky alebo prípravku. V prípade jednoduchých molekúl s nízkou molekulovou hmotnosťou a jednej alebo dvoch funkčných skupín možno predpokladať odchýlku 0,1 až 0,3 jednotiek log P_{Ow} medzi výsledkami rozličných fragmentačných metód a nameranou hodnotou. V prípade komplexnejších molekúl môžu byť hranice chyby väčšie. Bude to závisieť od spoľahlivosti a dostupnosti fragmentových konštánt, ako aj od schopnosti rozoznať vnútromolekulové interakcie (napr. vodíkové väzby) a správneho použitia korekčných členov (problém je jednoduchší pri použití počítačového softvéru CLOGP-3) (b). V prípade ionizujúcich prípravkov je dôležité správne zohľadnenie náboja alebo stupňa ionizácie.

▼B

Postupy výpočtov

Hanschova π-metóda

Pôvodná hydrofóbna substituenčná konštanta, π, ktorú zaviedol Fujita a kol. (f), je definovaná ako:

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

kde P_{ow} (PhX) je rozdeľovací koeficient aromatického derivátu a P_{ow} (PhH) je rozdeľovací koeficient pôvodnej látky alebo prípravku

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

Podľa tejto definície je metóda π (π-metóda) použiteľná predovšetkým na aromatickú substitúciu. Hodnoty π pre väčší počet substituentov boli zostavené do tabuľky (b) (c) (d). Používajú sa na výpočet hodnoty log P_{ow} pre aromatické molekuly alebo subštruktúry.

Rekkerova metóda

Podľa Rekkera (g) sa hodnota log P_{ow} vypočíta týmto spôsobom:

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

kde f_i predstavuje konštanty rozdielnych molekulových fragmentov a a_i frekvenciu ich výskytu v skúmanej molekule. Korekčné členy môžu byť vyjadrené ako integrálny (celý) násobok jednej jedinej konštanty C_m (tzv. „magickej konštanty“). Fragmentové konštanty f_i a C_m boli stanovené zo zoznamu 1 054 experimentálnych hodnôt P_{ow} (825 prípravkov) použitím zloženej regresnej analýzy (c) (h). Stanovenie interakčných členov sa vykonáva podľa stanovených pravidiel opísaných v odkazoch (e) (h) (i).

Hanschova-Leova metóda

Podľa Hanscha a Lea (c) sa hodnota log P_{ow} vypočíta z tohto vzťahu:

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

kde f_i predstavuje konštanty rozdielnych molekulových fragmentov, F_j korekčné členy a a_i,b_j príslušné frekvencie výskytu. Deriváciou z pokusných hodnôt P_{ow} bol metódou pokusov a chýb stanovený zoznam atómových a skupinových fragmentových hodnôt a zoznam korekčných členov F (tzv. „faktorov“). Korekčné členy boli usporiadané do niekoľkých rozdielnych tried (a) (c). Je relatívne komplikované a náročné načas zohľadniť všetky pravidlá a korekčné členy. Vyvinuté boli rôzne súbory programov (b).

Kombinovaná metóda

Výpočet hodnoty log P_{ow} komplexných molekúl sa dá do značnej miery zdokonaliť, ak sa molekula rozdelí na väčšie subštruktúry, pre ktoré existujú spoľahlivé hodnoty log P_{ow}, a to buď z tabuliek (b) (c), alebo z vlastných meraní príslušného laboratória. Takéto fragmenty (napr. heterocykly, antrachinón, azobenzén) sa potom môžu kombinovať s Hanschovými hodnotami π alebo s Rekkerovými, alebo Leovými fragmentovými konštantami.

Poznámky

i) Výpočtové metódy sa dajú použiť iba pre čiastočne alebo úplne ionizované prípravky, keď možno vziať do úvahy potrebné korekčné faktory.

▼B

ii) Ak možno predpokladať vnútromolekulové väzby, je potrebné prirátať zodpovedajúci korekčný člen (približne + 0,6 až + 1,0 log P_{ow} jednotiek). Indikácie týkajúce sa prítomnosti takýchto väzieb možno získať zo stereomodelov príslušnej molekuly alebo zo spektroskopických údajov o nej.

iii) Ak sú možné viaceré tautomérne formy, za základ výpočtu by sa mala použiť najpravdepodobnejšia forma.

iv) Je potrebné pozorne sledovať všetky úpravy, resp. revidované vydania, zoznamov fragmentových konštánt.

Správa

Ak sa použijú výpočtové alebo odhadové metódy, potom správa z testu obsahuje nasledujúce informácie:

— opis testovanej látky (zmes, prímesi atď.),

— indikácie (údaje) týkajúce sa všetkých možných vnútromolekulových vodíkových väzieb, disociácií, nábojov a všetkých ostatných nezvyčajných efektov (napr. tautomérie),

— opis použitej výpočtovej metódy,

— identifikáciu alebo spôsob zásobovania databázy,

— zvláštnosti vo výbere (voľbe) fragmentov,

— kompletnú dokumentáciu výpočtov.

ODKAZY

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼B

Dodatok 2

Odporúčané referenčné látky pre metódu HPLC

Číslo	Referenčná látka	log P_{ow}	pKa
1	2-butanón	0,3	
2	4acetylpyridín	0,5	
3	anilín	0,9	
4	acetanilid	1,0	
5	benzylalkohol	1,1	
6	4-metoxyfenol	1,3	pK_a = 10,26
7	kyselina fenoxyoctová	1,4	pK_a = 3,12
8	fenol	1,5	pK_a = 9,92
9	2,4dinitrofenol	1,5	pK_a = 3,96
10	benzonitril	1,6	
11	fenylacetonitril	1,6	
12	4metylbenzylalkohol	1,6	
13	acetofenón	1,7	
14	2nitrofenol	1,8	pK_a = 7,17
15	kyselina 3nitrobenzoová	1,8	pK_a = 3,47
16	4chlóranilín	1,8	pK_a = 4,15
17	nitrobenzén	1,9	
18	3fenylpropán2ol	1,9	
19	kyselina benzoová	1,9	pK_a = 4,19
20	p krezol	1,9	pK_a = 10,17
21	kyselina škoricová	2,1	pK_a = 3,89 cis 4,44 trans
22	anizol	2,1	
23	metylbenzoát	2,1	
24	benzén	2,1	
25	kyselina 3 metylbenzoová	2,4	pK_a = 4,27
26	4 chlórfenol	2,4	pK_a = 9,1
27	trichlóretylén	2,4	
28	atrazín	2,6	
29	etylbenzoát	2,6	
30	2,6dichlórbenzonitril	2,6	
31	kyselina 3 chlórbenzoová	2,7	pK_a = 3,82
32	toluén	2,7	
33	naftalénlol	2,7	pK_a = 9,34
34	2,3dichlóranilín	2,8	
35	chlórbenzén	2,8	
36	alylfenyléter	2,9	
37	brómbenzén	3,0	

▼B

Číslo	Referenčná látka	log P_{ow}	pKa
38	etylbenzén	3,2	
39	benzofenón	3,2	
40	4fenylfenol	3,2	pK_a = 9,54
41	tymol	3,3	
42	l,4dichlórbenzén	3,4	
43	difenylamín	3,4	pK_a = 0,79
44	naftalén	3,6	
45	fenylbenzoát	3,6	
46	izopropylbenzén	3,7	
47	2,4,6trichlórfenol	3,7	pK_a = 6
48	bifenyl	4,0	
49	benzylbenzoát	4,0	
50	2,4dinitro6sekbutylienol	4,1	
51	1,2,4 trichlórbenzén	4,2	
52	kyselina dodekánová	4,2	
53	difenyléter	4,2	
54	nbutylbenzén	4,5	
55	fenantrén	4,5	
56	fluorantén	4,7	
57	dibenzyl	4,8	
58	2,6difenylpyridín	4,9	
59	trifenylamín	5,7	
60	DDT	6,2	
	Iné referenčné látky s nízkou log P_{ow} látky s nízkou hodnotou log P_{ow}		
1	kyselina nikotínová	- 0,07	

▼B

A.9. TEPLOTA VZPLANUTIA

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Odporúča sa získať predbežné informácie o zápalnosti, resp. horľavosti, látky ešte pred uskutočnením tohto testu. Postup testu sa dá aplikovať na kvapalné látky, ktorých pary môžu byť zapálené zapaľovacími zdrojmi. Skúšobné metódy uvedené v tomto texte sú spoľahlivé iba pre rozmedzia teploty vzplanutia, ktoré sú špecifikované v jednotlivých metódach.

Pri voľbe metódy, ktorá sa má použiť, by sa malo uvážiť, či nemôže dôjsť k chemických reakciám medzi látkou a nosičom vzorky.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Teplota vzplanutia je najnižšia teplota korigovaná na tlak 101,325 kPa, pri ktorej kvapalina uvoľňuje pary, za podmienok definovaných v skúšobnej metóde v takom množstve, že v skúšobnej nádobe sa vytvorí zápalná (horľavá) zmes pár a vzduchu.

Jednotky: ^{o}C

$t = T - 273,15$

(t v ^{o}C a T v K)

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky sa nemusia použiť vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová chemická látka. V prvom rade slúžia na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

1.4. PRINCÍP METÓDY

Látka sa umiestni do skúšobnej nádoby a zohrieva sa na testovaciu teplotu podľa postupu opísaného v príslušnej skúšobnej metóde. Zápalné (horľavé) pokusy sa uskutočňujú na účely zistenia, či testovaná vzorka pri počiatočnej teplote vzplanie, alebo nie.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

1.5.1. **Opakovateľnosť**

Opakovateľnosť sa mení v závislosti od rozmedzia teploty vzplanutia a od použitej skúšobnej metódy; maximum 2 ^{o}C.

1.5.2. **Citlivosť**

Citlivosť závisí od použitej skúšobnej metódy.

1.5.3. **Špecifickosť**

Špecifickosť niektorých skúšobných metód je obmedzená na určité rozmedzia teploty vzplanutia a je závislá od údajov týkajúcich sa vlastností testovanej látky (napr. vysoká viskozita).

▼B

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Príprava**

Vzorka príslušnej testovanej látky sa umiestni do skúšobného prístroja podľa 1.6.3.1 a/alebo 1.6.3.2.

Kvôli bezpečnosti sa odporúča, aby sa pre látky s vysokou energiou alebo pre jedovaté látky použila metóda, v rámci ktorej sa testujú iba vzorky s malým objemom, približne 2 cm^3.

1.6.2. **Podmienky skúšania**

Ak to zodpovedá bezpečnostným predpisom, prístroj sa postaví na miesto, kde nie je vystavený prievanu.

1.6.3. **Realizácia testu**

1.6.3.1. *Rovnovážna metóda*

Pozri technické normy ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. *Nerovnovážna metóda*

Abelov prístroj:

Pozri technické normy BS 2000, časť 170, NF M 07-011, NF T 66-009.

Abelov-Penskyho prístroj:

Pozri technické normy EN 57, DIN 51755 časť 1 (pre teploty od 5 °C do 65 °C), DIN 51755 časť 2 (pre teploty pod 5 °C), NF M07-036.

Tagov prístroj:

Pozri technickú normu ASTM D 56.

Penskyho-Martensov prístroj:

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

Poznámky:

Ak sa zistí, že teplota vzplanutia stanovená nerovnovážnou metódou uvedenou v 1.6.3.2 je 0 °C ± 2 °C, 21 °C ± 2 °C alebo 55 °C ± 2 °C, mala by byť potvrdená rovnovážnou metódou pri použití toho istého prístroja.

Na oznamovanie sa smú použiť iba tie metódy, ktoré sú schopné vyvinúť teplotu vzplanutia predmetnej testovanej látky.

Na stanovenie teploty vzplanutia viskóznych kvapalín (farbív, živíc a podobných látok) obsahujúcich rozpúšťadlá sa smú použiť iba prístroje a skúšobné metódy vhodné na stanovovanie teploty vzplanutia viskóznych kvapalín.

Pozri technické normy ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 časť 1.

▼B

2. **ÚDAJE**

3. **SPRÁVA**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

— presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímesi),

— treba uviesť použitú metódu, ako aj všetky prípadné odchýlky,

— výsledky a všetky doplnkové poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

4. **ODKAZY**

Žiadne.

▼B

A.10. HORĽAVOSŤ (TUHÉ LÁTKY)

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Pred realizáciou tohto testu sa odporúča získať predbežné informácie o potenciálne explozívnych vlastnostiach látky.

Tento test by sa mal použiť iba v prípade práškových, granulovaných alebo pastovitých látok.

Aby neboli zahrnuté všetky látky, ktoré môžu byť zapálené, ale iba tie, ktoré horia rýchlo, alebo tie, ktorých spôsob horenia je v každom prípade mimoriadne nebezpečný, za veľmi horľavé sa považujú iba tie látky, ktorých rýchlosť horenia presahuje určitú medznú hodnotu.

Môže byť mimoriadne nebezpečné, ak sa žeravenie šíri kovovým práškom, pretože je potom veľmi ťažké zahasiť oheň. Kovové prášky treba považovať za vysokohorľavé, ak podporujú šírenie žeravenia cez hmotu v priebehu stanoveného času.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Čas horenia je vyjadrený v sekundách.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Nie sú špecifikované.

1.4. PRINCÍP METÓDY

Látka sa sformuje do neprerušeného prúžku alebo práškovej čiary v dĺžke asi 250 mm a uskutoční sa predbežný skríningový test na stanovenie toho, či po zapálení plameňom plynového horáka dôjde k šíreniu horenia plameňom alebo tlením. Ak dôjde k šíreniu po dĺžke čiary aspoň 200 mm v priebehu stanoveného času, uskutoční sa následne kompletný testový program na stanovenie rýchlosti horenia.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Nie sú stanovené.

▼B

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Predbežný skríningový test**

Látka sa sformuje do neprerušeného prúžku alebo práškovej čiary v dĺžke asi 250 mm, so šírkou 20 mm a hrúbkou 10 mm na nehorľavej (ohňovzdornej), nepórovitej podkladovej doske s nízkou tepelnou vodivosťou. K jednému koncu práškovej čiary sa priloží horúci plameň plynového horáka (s minimálnym priemerom 5 mm) a podrží sa, kým sa prášok nezapáli (nevznieti), alebo počas maximálne 2 minút (5 minút v prípade kovových práškov alebo práškov kovových zliatin). Treba sledovať, či sa horenie rozšíri po dĺžke 200 mm práškovej čiary v priebehu 4-minútovej testovej periódy (alebo 40-minútovej periódy v prípade kovových práškov). Ak sa látka nezapáli a spaľovanie sa nerozšíri buď horením plameňom, alebo tlením po dĺžke 200 mm práškovej čiary v priebehu 4-minútovej (alebo 40-minútovej) testovej periódy, príslušná testovaná látka sa nepovažuje za vysokohorľavú, v takom prípade sa nepožaduje jej ďalšie testovanie. Ak sa horenie látky rozšíri po 200 mm dĺžke práškovej čiary za čas kratší ako 4 minúty alebo za čas kratší ako 40 minút v prípade kovových práškov, treba uskutočniť postup uvedený v nasledujúcom texte (bod 1.6.2 a nasledujúce body).

1.6.2. **Test rýchlosti horenia**

1.6.2.1. *Príprava*

Práškové alebo granulované testované látky sa zvoľna nasypú do formy s dĺžkou 250 mm, s trojuholníkovitým prierezom, s vnútornou výškou 10 mm a šírkou 20 mm. Na obidvoch stranách formy sú v pozdĺžnom smere namontované dve kovové lišty, ktoré slúžia ako bočné ohraničenie a ktoré prečnievajú 2 mm ponad vrchný okraj trojuholníkovitého prierezu (pozri obrázok). Forma sa potom zdvihne do výšky 2 cm a trikrát za sebou sa pustí, aby dopadla na tvrdý podklad, čím sa prášok utrasie. Ak je to potrebné, forma sa znova doplní práškom. Bočné kovové lišty sa potom odstránia a prebytočná testovaná látka (vo forme prášku) sa zhrnie. Na vrchnú stranu formy sa potom položí nehorľavá (ohňovzdorná), nepórovitá podkladová doska s nízkou tepelnou vodivosťou, prístroj sa obráti spodnou časťou navrch a forma sa odstráni.

Pastovité látky sa nanesú vo forme črievka s dĺžkou 250 mm a s prierezom s plochou približne 1 cm^2 na nehorľavú (ohňovzdornú), nepórovitú podkladovú dosku s nízkou tepelnou vodivosťou.

1.6.2.2. *Podmienky skúšania*

V prípade látky, ktorá je citlivá na vlhkosť, sa musí test uskutočniť v čo najkratšom čase po vyňatí látky z obalu.

1.6.2.3. *Realizácia testu*

Umiestnite hranicu z práškovej testovanej látky do digestora priečne na smer prúdenia vzduchu.

Rýchlosť prúdenia vzduchu musí byť dostatočná na to, aby sa zabránilo úniku spalín do ovzdušia laboratória, a počas testu by sa nemala meniť. Okolo prístroja by mala byť postavená protiprievanová zástena.

Hranica z práškovej testovanej látky sa na jednom konci zapáli pomocou horúceho plameňa plynového horáka (minimálny priemer 5 mm). Keď hranica prehorela vzdialenosť 80 mm, na úseku ďalších 100 mm sa zmeria rýchlosť horenia.

▼B

Test sa opakuje šesťkrát, pokiaľ sa pozitívny výsledok nezaregistroval už skôr, pričom zakaždým sa použije čistá a chladná podkladová doska.

2. **ÚDAJE**

Na vyhodnotenie je smerodajný čas horenia z predbežného skríningového testu (1.6.1) a najkratší čas horenia z maximálne šiestich opakovaní hlavného testu (1.6.2.3).

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

— presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímesi),

— opis látky určenej na testovanie, jej fyzikálny stav vrátane obsahu vlhkosti,

— výsledky z predbežného skríningového testu a z testu rýchlosti horenia, ak sa tento test tiež uskutočnil,

— všetky doplňujúce poznámky a pripomienky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Práškovité, granulované alebo pastovité látky treba považovať za veľmi horľavé, ak čas horenia v každom teste uskutočnenom podľa skúšobného postupu opísaného v 1.6.2 je kratší ako 45 sekúnd. Kovové prášky alebo prášky kovových zliatin sa považujú za vysokohorľavé, keď sa dajú zapáliť a ak sa plameň alebo zóna reakcie rozšíri po celej dĺžke vzorky za 10 minút alebo za kratší čas.

4. **ODKAZY**

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

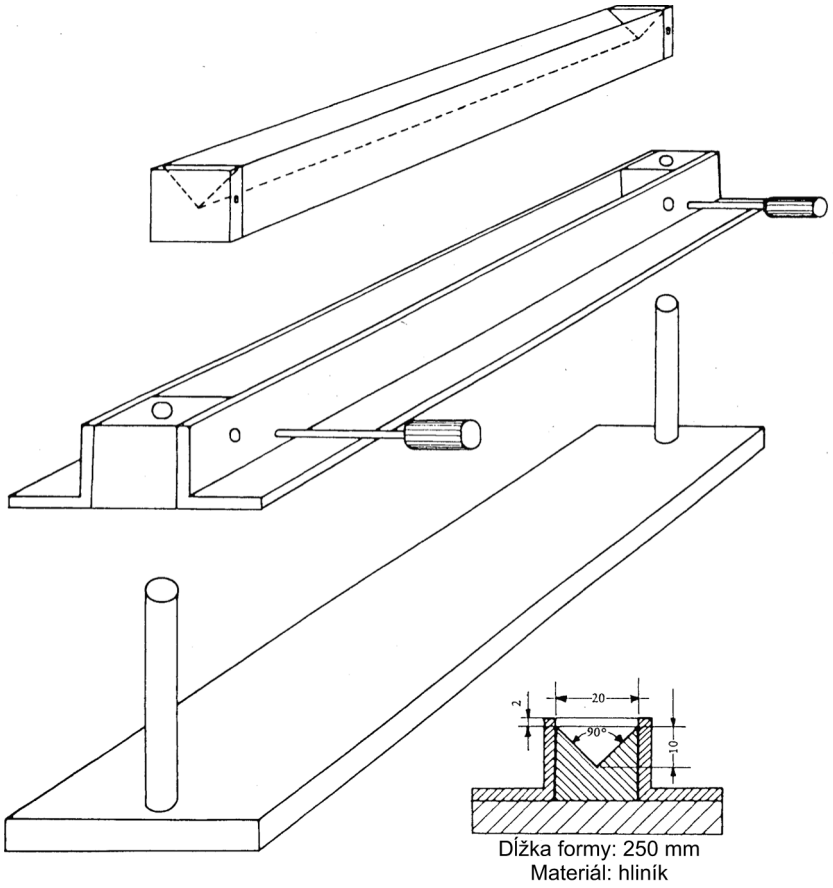
▼B

Dodatok

Obrázok

Forma a príslušenstvo na prípravu hranice z práškovitej testovanej látky

(všetky rozmery sa uvádzajú v milimetroch)



▼B

A.11. HORĽAVOSŤ (PLYNY)

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Táto metóda umožňuje stanovenie toho, či sú plyny zmiešané so vzduchom pri teplote miestnosti (približne 20 °C) a pri atmosférickom tlaku horľavé, a ak áno, v akom rozsahu koncentrácií. Zmesi s narastajúcimi koncentráciami plynu vo vzduchu sú vystavené elektrickej iskre a sleduje sa, či dôjde k zapáleniu (vzplanutiu).

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Rozsah zápalnosti je rozmedzie koncentrácie medzi dolnou a hornou medzou výbušnosti. Dolná a horná medza výbušnosti predstavuje tie medzné hodnoty koncentrácie horľavého plynu v prímesi so vzduchom, pri ktorých sa neobjavuje šírenie plameňa.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Nie sú špecifikované.

1.4. PRINCÍP METÓDY

Koncentrácia plynu vo vzduchu sa postupne zvyšuje a zmes je vystavená pri každej koncentrácii elektrickej iskre.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Nie sú stanovené.

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Prístroje**

Testovacou nádobou je stĺpcovitý sklený valec s minimálnym vnútorným priemerom 50 mm a s minimálnou výškou 300 mm. Zapaľovacie elektródy sú oddelené vzdialenosťou 3 mm až 5 mm a sú umiestnené vo výške 60 mm nad dnom valca. Valec je vybavený otvorom na znižovanie tlaku. Prístroj musí byť chránený krytom, aby sa obmedzili akékoľvek škody spôsobené výbuchom.

Ako zapaľovací zdroj sa používa stojatá indukovaná iskra s 0,5-sekundovým trvaním, ktorá sa generuje z vysokonapäťového transformátora s výstupným koncovým napätím 10 až 15 kV (maximálny príkon 300 W). Príklad vhodného použiteľného prístroja je opísaný v odkazoch (2).

1.6.2. **Podmienky skúšania**

Test sa musí uskutočniť pri teplote miestnosti (približne 20 °C).

▼B

1.6.3. **Realizácia testu**

S použitím dávkovacích čerpadiel sa do skleného valca napustí známa koncentrácia plynu vo vzduchu. Cez zmes sa nechá preletieť iskra a sleduje sa, či sa zo zapaľovacieho zdroja oddelí plameň a začne sa nezávisle šíriť alebo nie. Koncentrácia plynu sa mení, resp. zvyšuje, postupne po jednom objemovom percente, až kým nedôjde k zapáleniu zmesi podľa vyššie uvedeného opisu.

Ak štruktúra plynu naznačuje, že daný plyn je pravdepodobne nehorľavý a že sa dá vypočítať stechiometrická zmes so vzduchom, treba v jednopercentných krokoch testovať iba zmesi v rozmedzí od 10 % pod stechiometrickou koncentráciou do 10 % nad touto koncentráciou.

2. **ÚDAJE**

Šírenie plameňa je jediným relevantným informačným údajom na stanovenie tejto vlastnosti.

3. **SPRÁVA**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

— presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímesi),

— opis použitého prístroja s uvedenými rozmermi,

— teplotu, pri ktorej sa test uskutočnil,

— testované koncentrácie a získané výsledky,

— výsledok testu: nehorľavý alebo mimoriadne horľavý plyn,

— ak sa dospelo k záveru, že testovaný plyn je nehorľavý, treba uviesť rozsah koncentrácií, v rámci ktorého bol testovaný v 1 % krokoch,

— musia byť uvedené všetky informácie a poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

4. **ODKAZY**

(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-Wortmann, T. Redeker und H. Schacke. „Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen“. Chem.-Ing.-Tech. 1984, vol. 56, 2, 126 – 127.

▼B

A.12. **HORĽAVOSŤ (KONTAKT S VODOU)**

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Táto testovacia metóda sa môže použiť na stanovenie toho, či reakcia testovanej látky s vodou alebo vlhkým vzduchom vedie k vyvíjaniu nebezpečných množstiev plynu alebo plynov, ktoré môžu byť mimoriadne horľavé.

Testovacia metóda sa môže použiť pre tuhé, ako aj kvapalné látky. Táto metóda sa nedá použiť pre látky, ktoré sa spontánne zapaľujú (vznecujú) pri kontakte so vzduchom.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Mimoriadne horľavé: látky, ktoré v kontakte s vodou alebo vzdušnou vlhkosťou uvoľňujú mimoriadne horľavé plyny v nebezpečných množstvách pri minimálnej rýchlosti 1 l/kg za hodinu.

1.3. PRINCÍP METÓDY

Látka sa testuje podľa poradia krokov opísaných v nasledujúcich odsekoch. Ak v rámci ktoréhokoľvek kroku dôjde k zapáleniu (vznieteniu), ďalšie testovanie už nie je potrebné. Ak je známe, že testovaná látka nereaguje búrlivo s vodou, možno postúpiť rovno ku kroku 4 (1.3.4).

1.3.1. **Krok 1**

Testovaná látka sa umiestni do vaničky obsahujúcej destilovanú vodu pri teplote 20 °C a sleduje sa, či sa uvoľnený plyn zapáli (vznieti) alebo nie.

1.3.2. **Krok 2**

Testovaná látka sa umiestni pri teplote 20 °C na filtračný papier plávajúci na hladine destilovanej vody v nádobe a sleduje sa, či sa uvoľnený plyn zapáli (vznieti) alebo nie. Filtračný papier slúži výlučne na to, aby sa testovaná látka udržiavala na jednom mieste na účely zvýšenia pravdepodobnosti zapálenia (vznietenia) látky.

1.3.3. **Krok 3**

Z testovanej látky sa urobí kôpka približne 2 cm vysoká s priemerom 3 cm. Do kôpky sa pridá niekoľko kvapiek vody a sleduje sa, či sa uvoľnený plyn zapáli (vznieti) alebo nie.

1.3.4. **Krok 4**

Testovaná látka sa zmieša s destilovanou vodou pri teplote 20 °C a rýchlosť uvoľňovania plynu sa meria sedem hodín, vždy v jednohodinových intervaloch. Ak je rýchlosť uvoľňovania plynu po uplynutí siedmich hodín nestála alebo narastá, čas merania možno predĺžiť na maximálny čas piatich dní. Test možno kedykoľvek zastaviť, ak rýchlosť uvoľňovania plynu prekročí hodnotu 1 l/kg za hodinu.

▼B

1.4. REFERENČNÉ LÁTKY

Nie sú špecifikované.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Nie sú stanovené.

1.6. OPIS METÓD

1.6.1. **Krok 1**

1.6.1.1. *Podmienky skúšania*

Test sa uskutočňuje pri teplote miestnosti (približne 20 °C).

1.6.1.2. *Realizácia testu*

Malé množstvo testovanej látky (s priemerom približne 2 mm) sa umiestni do vaničky obsahujúcej destilovanú vodu. Treba sledovať a zaznamenať, či i) sa vôbec nejaký plyn uvoľnil a či ii) došlo k zapáleniu (vznieteniu) plynu. Ak došlo k zapáleniu (vznieteniu) plynu, tak už nie je potrebné ďalšie testovanie látky, pretože látka sa týmto považuje za nebezpečnú.

1.6.2. **Krok 2**

1.6.2.1. *Prístroje*

Filtračný papier sa naplocho položí na hladinu destilovanej vody naliatej do vhodnej nádoby, napr. do odparovacej misky s priemerom 100 mm.

1.6.2.2. *Podmienky skúšania*

Test sa uskutočňuje pri teplote miestnosti (približne 20 °C).

1.6.2.3. *Realizácia testu*

Malé množstvo testovanej látky (s priemerom približne 2 mm) sa umiestni do stredu filtračného papiera. Treba sledovať a zaznamenať, či i) sa vôbec nejaký plyn uvoľnil a či ii) došlo k zapáleniu (vznieteniu) plynu. Ak došlo k zapáleniu (vznieteniu) plynu, tak už nie je potrebné ďalšie testovanie látky, pretože látka sa týmto považuje za nebezpečnú.

1.6.3. **Krok 3**

1.6.3.1. *Podmienky skúšania*

Test sa uskutočňuje pri teplote miestnosti (približne 20 °C).

1.6.3.2. *Realizácia testu*

Z testovanej látky sa urobí kôpka približne 2 cm vysoká, s priemerom 3 cm, s vrúbkovaním na vrcholku kôpky. Pridá sa niekoľko kvapiek vody a sleduje sa a zaznamenáva, či i) sa vôbec nejaký plyn uvoľnil a či ii) došlo k zapáleniu (vznieteniu) plynu. Ak došlo k zapáleniu (vznieteniu) plynu, tak už nie je potrebné ďalšie testovanie látky, pretože látka sa týmto považuje za nebezpečnú.

▼B

1.6.4. **Krok 4**

1.6.4.1. *Prístroje*

Prístroj je zostavený podľa nákresu na obrázku.

1.6.4.2. *Podmienky skúšania*

Skontrolujte testovanú látku v prepravnom obale z hľadiska prítomnosti prášku s veľkosťou častíc < 500 μm. Ak prášok tvorí viac ako 1 % hmotnosti alebo ak je vzorka drobivá, tak sa pred uskutočnením testu musí celé množstvo látky rozomlieť na prach vzhľadom na redukciu veľkosti častíc počas skladovania a manipulácie. V ostatných prípadoch sa látka testuje v takom stave, v akom bola doručená. Test sa musí uskutočniť pri teplote miestnosti (približne 20 ^{o}C) a pri normálnom atmosférickom tlaku.

1.6.4.3. *Realizácia testu*

Do odkvapkávajúceho lievika prístroja sa pridá 10 až 20 ml vody a do Erlenmeyerovej banky sa pridá 10 g testovanej látky. Objem uvoľneného plynu sa dá merať akýmkoľvek vhodným prostriedkom. Kohútik oddeľovacieho lievika sa otvorí, aby sa voda dostala do Erlenmeyerovej banky, a zároveň sa zapnú stopky. Uvoľňovanie plynu sa meria každú hodinu počas siedmich hodín. Ak je počas tohto času uvoľňovanie plynu nestále (kolísavé) alebo ak po uplynutí tohto času uvoľňovanie plynu ešte narastá, meranie môže pokračovať ešte maximálne päť dní. Ak v ktoromkoľvek čase rýchlosť uvoľňovania plynu prekročí hodnotu 1 l/kg/hod, test možno zastaviť. Tento test sa musí trojnásobne zopakovať.

Ak je identita plynu neznáma, plyn sa musí analyzovať. Keď plyn obsahuje mimoriadne horľavé zložky a nie je známe, či je celá zmes mimoriadne horľavá, treba pripraviť zmes toho istého zloženia a potom ju testovať podľa metódy A.11.

2. **ÚDAJE**

Testovaná látka sa považuje za nebezpečnú, ak:

— dôjde k spontánnemu zapáleniu (vznieteniu) počas ktoréhokoľvek kroku skúšobného postupu

alebo

— dochádza k uvoľňovaniu horľavého (vznetlivého) plynu pri rýchlosti (miere) väčšej ako 1 l/kg látky za hodinu.

3. **SPRÁVA**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

— presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímesi),

— podrobnosti o akejkoľvek počiatočnej príprave testovanej látky,

▼B

— výsledky testu (kroky 1, 2, 3 a 4),

— identifikáciu uvoľneného plynu,

— rýchlosť (mieru) uvoľňovania plynu, ak sa uskutočňuje krok 4 (1.6.4),

— všetky doplnkové poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

4. **ODKAZY**

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

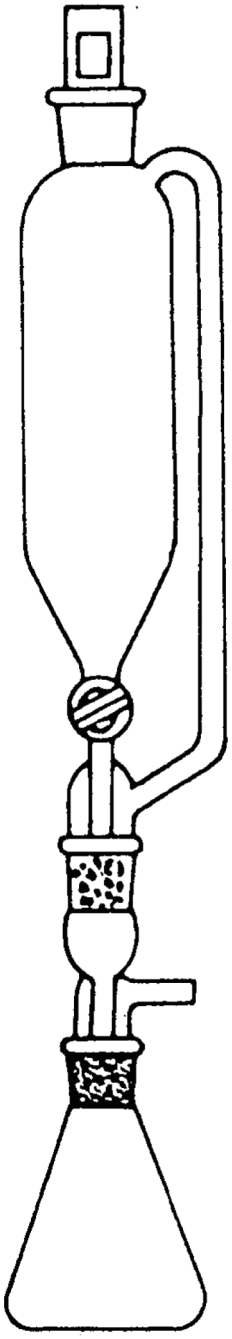
(2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Dodatok

Obrázok

Prístroj



▼B

A.13. **SAMOZÁPALNÉ VLASTNOSTI TUHÝCH LÁTOK A KVAPALÍN**

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Postup testu sa dá použiť pre tuhé alebo kvapalné látky, ktoré sa v malých množstvách samovoľne vznietia krátky čas po tom, čo sa dostali do kontaktu so vzduchom pri teplote miestnosti (približne 20 °C).

Látky, ktoré musia byť vystavené pôsobeniu vzduchu počas niekoľkých hodín alebo dní pri teplote miestnosti alebo pri zvýšenej teplote, kým dôjde k ich vznieteniu, nie sú pokryté touto testovacou metódou.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Látky so sklonom k samovznieteniu sa považujú za také vtedy, ak sa vznietia alebo spôsobia zuhoľnatenie za podmienok opísaných v 1.6.

Môže byť potrebné testovať aj samozápalnosť kvapalín použitím metódy A.15 – Teplota samovznietenia (kvapaliny a plyny).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Nie sú špecifikované.

1.4. PRINCÍP METÓDY

Testovaná látka, či už tuhá, alebo kvapalná, sa pridá do inertnej nosnej látky a vystaví sa kontaktu so vzduchom pri teplote okolitého prostredia na päť minút. Ak sa kvapalné látky nevznietia, tak sa absorbujú do filtračného papiera a vystavia sa pôsobeniu vzduchu pri teplote okolitého prostredia (približne 20 °C) na päť minút. Ak sa testovaná tuhá látka alebo kvapalina vznieti alebo ak kvapalina zapáli alebo zuhoľnatí filtračný papier, testovaná látka sa považuje za látku so sklonom k samovznieteniu.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Opakovateľnosť: z bezpečnostných dôvodov na potvrdenie sklonu samovznietenia testovanej látky postačí jediný pozitívny výsledok.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

1.6.1. **Prístroje**

Porcelánová miska s priemerom približne 10 cm sa naplní kremelinou do výšky asi 5 mm pri teplote miestnosti (približne 20 °C).

Poznámka:

Kremelinu alebo akúkoľvek inú porovnateľnú inertnú látku, ktorá je bežne k dispozícii, treba považovať za látku zastupujúcu zeminu, na ktorú sa v prípade nehody testovaná látka môže roztrieštiť.

Suchý filtračný papier sa požaduje na testovanie kvapalín, ktoré sa nevznietia pri kontakte so vzduchom, keď sú v kontakte s inertnou nosnou látkou.

▼B

1.6.2. **Realizácia testu**

a) *Práškové tuhé látky*

Množstvo 1 cm^3 až 2 cm^3 práškovej látky určenej na testovanie sa nasype z výšky približne 1 m na nehorľavý (ohňovzdorný) povrch a sleduje sa, či sa testovaná látka vznieti počas pádu alebo v priebehu piatich minút po spočinutí na nehorľavom povrchu.

Test sa opakuje šesťkrát za sebou, pokiaľ nedôjde k vznieteniu testovanej látky.

b) *Kvapaliny*

Približne 5 cm^3 kvapaliny určenej na testovanie sa naleje do pripravenej porcelánovej misky a sleduje sa, či sa testovaná látka vznieti v priebehu piatich minút.

Ak v rámci šiestich opakovaných testov nedôjde k vznieteniu testovanej látky, treba vykonať nasledujúci test:

Testovaná vzorka s objemom 0,5 ml sa nanesie injekčnou striekačkou na zvlnený filtračný papier a sleduje sa, či dôjde k zapáleniu alebo zuhoľnateniu filtračného papiera v priebehu piatich minút od pridania testovanej kvapaliny. Test sa opakuje trikrát za sebou, pokiaľ nedôjde k zapáleniu alebo zuhoľnateniu.

2. **ÚDAJE**

2.1. PRÁCA S VÝSLEDKAMI

Testovanie môže byť zastavené, len čo sa v ktoromkoľvek čiastkovom teste objaví pozitívny výsledok.

2.2. VYHODNOTENIE

Ak sa testovaná látka vznieti v priebehu piatich minút po pridaní do inertnej nosnej látky a vystavení pôsobeniu vzduchu alebo ak kvapalná testovaná látka zuhoľnatie alebo zapáli filtračný papier po jej pridaní na toto médium a po vystavení pôsobeniu vzduchu, tak sa považuje za samozápalnú.

3. **SPRÁVA**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

— presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímesi),

— výsledky testov,

— všetky doplnkové poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

4. **ODKAZY**

(1) NF T 20-039 (SEPT 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. VÝBUŠNÉ VLASTNOSTI

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Metóda schematicky opisuje spôsob testovania na účely stanovenia, či tuhá alebo pastovitá látka predstavuje nebezpečenstvo výbuchu, keď je vystavená účinku plameňa (citlivosť na teplo) alebo nárazu, alebo treniu (citlivosť na mechanické podnety), a či kvapalná látka predstavuje nebezpečenstvo výbuchu, keď je vystavená účinku plameňa alebo nárazu.

Metóda pozostáva z troch častí:

a) testu citlivosti na teplo (1);

b) testu citlivosti na mechanické podnety vo forme nárazu (1);

c) testu citlivosti na mechanické podnety vo forme trenia (1).

Metóda poskytuje údaje na zhodnotenie a stanovenie pravdepodobnosti vyvolania výbuchu určitými bežnými podnetmi. Metóda nie je určená na zisťovanie skutočnosti, či určitá látka je schopná výbuchu za akýchkoľvek podmienok.

Metóda je vhodná na stanovenie toho, či príslušná látka bude predstavovať nebezpečenstvo výbuchu (citlivosť na teplo a mechanické podnety) za konkrétnych podmienok špecifikovaných v smernici. Je založená na celom rade typov prístroja, ktoré sa vo veľkej miere používajú medzinárodne (1) a ktoré dávajú účelné a jednoznačné výsledky. Platí však všeobecný názor, že metóda nie je definitívna. Ako alternatívu k špecifikovanému prístroju možno použiť aj iné prístroje, avšak za predpokladu, že tieto sú medzinárodne uznané a že ich výsledky sa dajú adekvátne zosúladiť s príslušnými výsledkami získanými pomocou špecifikovaného prístroja.

Testy sa nemusia uskutočniť, ak existujúce termodynamické informácie (napr. zlučovacie teplo, rozkladné teplo), resp. absencia určitých reaktívnych skupín (2) v štrukturálnom vzorci, dôvodne potvrdzujú domnienku, že príslušná látka nie je schopná rýchleho rozkladu s tvorbou plynov alebo uvoľňovaním tepla (t. j. že materiál nepredstavuje žiadne riziko výbuchu). Pre kvapaliny sa nepožaduje test citlivosti na mechanické podnety vo forme trenia.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Výbušné látky:

Látky, ktoré v špecifikovanom prístroji môžu vybuchnúť účinkom plameňa alebo ktoré sú citlivé na nárazy alebo trenie (alebo sú citlivejšie na mechanické podnety než 1,3-dinitrobenzén v alternatívnom prístroji).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

1,3-dinitrobenzén, technický kryštalický produkt preosiaty na jemnosť častíc 0,5 mm pre metódu testovania citlivosti na trenie a nárazy.

Perhydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazín (čiže RDX, hexogén, cyklonit – CAS 121-82-4), rekryštalizovaný z vodného cyklohexanónu, navlhko preosievaný cez 250 μm a zachytávaný na 150 μm site a sušený pri teplote 103 °C ± 2 °C (počas 4 hodín) pre druhú sériu testov citlivosti na trenie a nárazy.

▼B

1.4. PRINCÍP METÓDY

Predbežné testy sú potrebné na vytvorenie bezpečných podmienok na uskutočnenie hlavných troch testov citlivosti.

1.4.1. **Testy bezpečnosti manipulácie (3)**

Z bezpečnostných dôvodov sa pred uskutočnením hlavných testov veľmi malé vzorky (približne 10 mg) látky určenej na testovanie vystavia zahrievaniu bez obmedzenia v plynovom plameni v akejkoľvek vhodnej forme prístroja, nárazu udieraním kyjaničky o nákovu a treniu v akejkoľvek forme trecieho mechanizmu. Cieľom je zistiť, či predmetná látka je taká citlivá a výbušná, že predpísané testy citlivosti, obzvlášť test citlivosti na teplo, sa musia uskutočniť so zvláštnou opatrnosťou, aby sa zabránilo prípadnému zraneniu laboratórneho pracovníka.

1.4.2. **Citlivosť na teplo**

Metóda spočíva v zohrievaní testovanej látky v oceľovej rúre uzavretej doštičkami s rozdielnymi priemermi otvoru na účely stanovenia, či má testovaná látka tendenciu vybuchovať v podmienkach intenzívneho tepla a definovaného obmedzenia.

1.4.3. **Citlivosť na mechanické podnety (náraz)**

Metóda spočíva vo vystavení testovanej látky nárazu spôsobenému telesom so špecifikovanou hmotnosťou pusteným zo špecifikovanej výšky.

1.4.4. **Citlivosť na mechanické podnety (trenie)**

Metóda spočíva vo vystavení tuhých alebo pastovitých látok treniu medzi štandardnými povrchmi za špecifikovaných podmienok zaťaženia a relatívneho pohybu.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Nie sú stanovené.

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Citlivosť na teplo (účinok plameňa)**

1.6.1.1. *Prístroje*

Prístroj pozostáva z jednorazovo použiteľnej oceľovej rúry s opakovateľne použiteľným uzavieracím zariadením (obrázok 1), inštalovanej do zohrievacieho a ochranného zariadenia. Každá rúra je zhotovená z hlbokoťažného oceľového plechu (pozri dodatok) a má vnútorný priemer 24 mm, dĺžku 75 mm a hrúbku steny 0,5 mm. Rúry sú na otvorenom konci upravené prírubou tak, aby sa umožnilo ich uzavretie zostavou uzáveru. Zostava uzáveru pozostáva z tlakuvzdornej doštičky s otvorom uprostred, tesne primknutej k rúre použitím dvojdielneho závitového spoja (matice a závitového goliera, okružia). Matica aj závitový golier sú vyrobené z chrómmangánovej ocele (pozri dodatok), ktorá je neiskrivá až do teploty 800 °C. Doštičky majú hrúbku 6 mm, sú vyrobené zo žiaruvzdornej ocele (pozri dodatok) a sú k dispozícii s rozličnými priemermi otvorov.

▼B

1.6.1.2. *Podmienky skúšania*

Za normálnych okolností sa látka testuje v takom stave, v akom ju dostali, hoci v niektorých prípadoch, napr. ak bola zlisovaná, liata alebo iným spôsobom kondenzovaná, je potrebné ju pred testovaním rozdrviť.

V prípade tuhých látok množstvo materiálu, ktoré sa má použiť v každom teste, sa stanoví použitím predbežného prípravného postupu „nasucho“. Dechtovaná rúra sa naplní množstvom 9 cm^3 testovanej látky, látka sa potom ubije silou 80 N vyvinutou na celý priečny profil rúry. Z bezpečnostných dôvodov alebo v prípade, kde fyzikálna forma látky môže byť zmenená tlakom, sa môžu použiť iné postupy jej plnenia do rúry, napr. ak je testovaná látka nadmerne citlivá na trenie, ubíjanie nepredstavuje vhodný postup. Ak je materiál stlačiteľný, pridá sa ho viac a potom sa ubíja dovtedy, kým v rúre nedosiahne úroveň 55 mm od vrchnej časti. Stanoví sa celkové množstvo použité na naplnenie rúry do výšky 55 mm od jej vrchnej časti a pridajú sa dve ďalšie doplnkové množstvá, každé ubité silou 80 N. Podľa potreby sa potom materiál ešte pridá ubíjaním alebo sa z neho odoberie tak, aby bola rúra naplnená do výšky 15 mm od jej vrchnej časti. Uskutoční sa druhé prípravné kolo „nasucho“, počnúc ubitým množstvom predstavujúcim jednu tretinu celkovej hmotnosti zistenej v prvom kole. Pri ubíjaní silou 80 N sa pridajú dve ďalšie doplnkové množstvá a podľa potreby pridaním alebo odobratím materiálu sa upraví jeho úroveň na výšku 15 mm od vrchnej časti rúry. Množstvo tuhej látky stanovené v druhom prípravnom kole „nasucho“ sa potom použije pre každý pokus. Plnenie sa uskutoční s tromi rovnakými množstvami, pričom každé sa stlačí na objem 9 cm^3 vyvinutím takej sily, aká je na to potrebná. (Postup sa dá uľahčiť použitím rozperných krúžkov.)

Kvapaliny a gély sa umiestnia do rúry do výšky 60 mm, pričom pri géloch treba dávať veľký pozor na to, aby sa zabránilo tvorbe dutín v materiáli. Zospodu sa na rúru nasunie závitový golier (okružie), priloží sa doštička s potrebnou veľkosťou otvoru uprostred a po pridaní malého množstva lubrikantu na báze sírnika molybdeničitého sa naplno utiahne matica. Je dôležité skontrolovať, či nezostali zvyškové množstvá testovanej látky zachytené medzi prírubou a doštičkou alebo v závitoch.

Zohrievanie sa zabezpečuje propánom odoberaným z priemyselnej tlakovej fľaše, ktorá je vybavená regulátorom tlaku (60 až 70 milibarov), cez merací prístroj (plynomer) a rovnomerne distribuovaným (ako to potvrdzuje vizuálne pozorovanie plameňov vychádzajúcich z horákov) rozdeľovacím potrubím k štyrom horákom. Horáky sú rozmiestnené okolo skúšobnej komory tak, ako je to znázornené na obrázku 1 v dodatku. Štyri horáky majú celkovú spotrebu asi 3,2 l propánu za minútu. Môžu sa použiť aj alternatívne vykurovacie plyny a horáky, ale rýchlosť ohrevu musí zodpovedať špecifikácii na obrázku 3. Pre všetky prístroje sa musí rýchlosť ohrevu periodicky kontrolovať použitím skúmaviek naplnených dibutylftalátom, ako je to znázornené na obrázku 3.

1.6.1.3. *Realizácia testov*

Každý test sa vykonáva dovtedy, pokiaľ sa každá rúra neroztrieši, alebo sa zahrieva až päť minút. Test s výsledným roztrieštením rúry na tri alebo viacero kusov, ktoré môžu byť v niektorých prípadoch spojené úzkymi pásikmi kovu, ako je to znázornené na obrázku 2, sa vyhodnocuje ako výbuch. Test, ktorého výsledkom je menej trieštivých úlomkov, alebo test, v rámci ktorého nedošlo vôbec k roztrieštení rúry, sa považuje za test bez výsledného výbuchu.

▼B

Najprv sa uskutoční séria troch testov s uzáverovými doštičkami s priemerom otvorov 6,0 mm, a ak nedôjde k výbuchu, uskutoční sa druhá séria troch testov s uzáverovými doštičkami s priemerom otvorov 2,0 mm. Ak dôjde k výbuchu v obidvoch sériách testov, realizácia ďalších testov sa už nepožaduje.

1.6.1.4. *Vyhodnotenie*

Výsledok testu sa považuje za pozitívny, ak dôjde k výbuchu v obidvoch horeuvedených sériách testov.

1.6.2. **Citlivosť na mechanické podnety (náraz)**

1.6.2.1. *Prístroje (obrázok 4)*

Hlavné časti typického prístroja s padacím bucharom pozostávajú z oceľovoliatinového bloku s podkladom, nákovy, stojanu, vodiacich líšt, padacích závaží, spúšťacieho mechanizmu a držiaka na vzorky. Oceľová nákova 100 mm (priemer) × 70 mm (výška) je priskrutkovaná k vrchnej strane oceľového bloku 230 mm (dĺžka) × 250 mm (šírka) × 200 mm (výška) s liatym podkladom 450 mm (dĺžka) × 450 mm (šírka) × 60 mm (výška). Stojan vyrobený z bezšvovej rúry z ťahanej ocele je upevnený v držiaku priskrutkovanom na zadnú časť oceľového bloku. Štyri skrutky zakotvujú prístroj k masívnemu betónovému kotevnému bloku s rozmermi 60 cm × 60 cm × 60 cm tak, aby vodiace lišty boli v absolútne vertikálnej polohe a aby padacie závažie po uvoľnení padalo voľne. Na použitie sú vhodné 5 kg a 10 kg závažia vyrobené z plnej ocele. Nárazová hlava každého závažia je zhotovená z kalenej ocele, HRC 60 až 63, a má minimálny priemer 25 mm.

Vzorka určená na testovanie je uzavretá v nárazovom mechanizme, ktorý pozostáva z dvoch koaxiálnych plných oceľových valcov umiestnených nad sebou v dutom valcovitom oceľovom vodiacom prstenci. Plné oceľové valce musia mať priemer 10 (-0,003, - 0,005) mm a výšku 10 mm, musia mať leštený povrch, zaoblené hrany (polomer oblúka 0,5 mm) a tvrdosť HRC 58 až 65. Dutý valec musí mať vonkajší priemer 16 mm, leštené vŕtanie s vnútorným priemerom 10 (+ 0,005, + 0,010) mm a výšku 13 mm. Nárazový mechanizmus je namontovaný na vloženú nákovu (priemer 26 mm a výška 26 mm) zhotovenú z ocele a centrovanú prstencom s perforáciami, aby sa umožnil únik spalín.

1.6.2.2. *Podmienky skúšania*

Vzorka by mala mať objem 40 mm^3 alebo objem, ktorý je vhodný pre alternatívny prístroj. Tuhé látky by sa mali testovať v suchom stave a mali by byť pripravené týmito spôsobmi:

a) práškové látky sa preosievajú (číslo sita 0,5 mm). Všetok materiál, ktorý prepadol cez sito, sa použije na skúšobné účely;

b) lisované, liate alebo iným spôsobom kondenzované látky sa rozdrvia na malé kúsky a preosejú sa. Na účely testovania sa použije frakcia zŕn s priemerom od 0,5 mm do 1 mm a mala by reprezentovať pôvodnú látku.

Látky, ktoré sa normálne dodávajú ako pasty, by sa mali v prípadoch, keď je to možné, testovať v suchom stave alebo v každom prípade po odstránení maximálne možného množstva riedidla, resp. rozpúšťadla. Kvapalné látky sa testujú s 1 mm medzerou medzi vrchným a spodným oceľovým valcom.

▼B

1.6.2.3. *Realizácia testov*

Vykoná sa séria šiestich testov s 10 kg padacím závažím púšťaným z výšky 0,40 m (40 J). Ak počas šiestich testov pri sile nárazu 40 J dôjde k výbuchu, treba pokračovať sériou ďalších šiestich testov s 5 kg padacím závažím púšťaným z výšky 0,15 m (7,5 J). V inom prístroji sa testovaná vzorka porovnáva so zvolenou referenčnou látkou použitím zavedeného postupu (napr. striedavou technikou „up and down“ atď.).

1.6.2.4. *Vyhodnotenie*

Výsledok testu sa považuje za pozitívny, ak dôjde k výbuchu (vyšľahnutie plameňa alebo úder sú ekvivalentné výbuchu) aspoň raz v niektorom z testov pri použití špecifikovaného nárazového prístroja alebo ak je testovaná vzorka citlivejšia ako 1,3-dinitrobenzén alebo RDX v alternatívnom teste citlivosti na náraz.

1.6.3. **Citlivosť na mechanické podnety (trenie)**

1.6.3.1. *Prístroje (obrázok 5)*

Trecí prístroj pozostáva z oceľovoliatinovej podkladovej dosky, na ktorú je namontovaný trecí mechanizmus. Tento sa skladá z fixovaného porcelánového kolíka a pohyblivej porcelánovej doštičky. Porcelánová doštička je nesená rámom, ktorý behá v dvoch vodiacich lištách. Rám je napojený na elektromotor ojnicou (spojovacou tyčou), excentrom a vhodným ozubeným prevodom tak, aby porcelánová doštička vykonala jednorazový pohyb späť a dopredu pod porcelánovým kolíkom na vzdialenosť 10 mm. Porcelánový kolík môže byť zaťažený silou napríklad 120 N alebo 360 N.

Ploché porcelánové doštičky sú vyrobené z bieleho technického porcelánu (hrubosť 9 μm až 32 μm) a majú rozmery 25 mm (dĺžka) × 25 mm (šírka) × 5 mm (výška). Valcovitý porcelánový kolík je takisto vyrobený z bieleho technického porcelánu a je 15 mm dlhý, má priemer 10 mm a zdrsnené sférické koncové plochy s polomerom ohybu 10 mm.

1.6.3.2. *Podmienky skúšania*

Testovaná vzorka by mala mať objem 10 mm^3 alebo objem, ktorý sa hodí pre alternatívny prístroj.

Tuhé látky sa testujú v suchom stave a sú pripravované týmito spôsobmi:

a) práškové látky sa preosievajú (číslo sita 0,5 mm); všetok materiál, ktorý prepadol cez sito, sa použije na skúšobné účely;

b) lisované, liate alebo iným spôsobom kondenzované látky sa rozdrvia na malé kúsky a preosejú sa; na účely testovania sa použije frakcia zŕn s priemerom < 0,5 mm.

Látky, ktoré sa normálne dodávajú ako pasty, by sa mali v prípadoch, keď je to možné, testovať v suchom stave. Ak látka určená na testovanie nemôže byť pripravená v suchom stave, pasta (po odstránení maximálneho možného množstva rozpúšťadla) sa testuje ako 0,5 mm hrubý, 2 mm široký a 10 mm dlhý film pripravený pomocou formy.

▼B

1.6.3.3. *Realizácia testov*

Porcelánový kolík sa nasmeruje na testovanú vzorku a zaťaží sa. Počas uskutočňovania testu musia hubové rysky porcelánovej doštičky ležať priečne na smer pohybu. Treba dbať na to, aby porcelánový kolík spočíval priamo na testovanej vzorke, aby sa pod kolíkom nachádzalo dostatočné množstvo testovaného materiálu, a tiež na to, aby sa porcelánová doštička pod kolíkom pohybovala správnym spôsobom. V prípade pastovitých látok sa na aplikáciu testovanej látky na doštičku používa 0,5 mm hrubá šablóna s 2 × 10 mm drážkou. Porcelánová doštička musí vykonať pohyb v dĺžke 10 mm dopredu a späť pod porcelánovým kolíkom za 0,44 sekundy. Každá časť povrchu doštičky a kolíka sa smie použiť iba raz; dva konce každého kolíka teda poslúžia na dva pokusy a každý z dvoch povrchov doštičky poslúži na tri pokusy.

Séria šiestich testov sa uskutoční so zaťažením 360 N. Ak sa počas týchto šiestich testov dosiahne pozitívny výsledok, musí sa uskutočniť ďalšia séria šiestich testov so zaťažením 120 N. V inom prístroji sa vzorka porovnáva so zvolenou referenčnou látkou použitím zavedeného postupu (napr. striedavou technikou „up and down“ atď.).

1.6.3.4. *Vyhodnotenie*

Výsledok testu sa považuje za pozitívny, ak dôjde k výbuchu (praskanie a/alebo úder alebo vyšľahnutie plameňa sú ekvivalentné výbuchu) aspoň raz v niektorom z testov so špecifikovaným trecím prístrojom alebo ak tento výsledok zodpovedá ekvivalentným kritériám v alternatívnom teste citlivosti na trenie.

2. **ÚDAJE**

V zásade sa príslušná látka podľa smernice považuje za nebezpečnú z hľadiska výbušnosti vtedy, ak sa dosiahol pozitívny výsledok v rámci testu citlivosti na teplo, náraz alebo trenie.

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

— identifikáciu, zloženie, čistotu, obsah vlhkosti atď. testovanej látky,

— fyzikálnu formu vzorky a údaje o tom, či bola rozdrvená, nalámaná, resp. preosiata, alebo nie,

— pozorovania počas testov citlivosti na teplo (napr. hmotnosť vzorky, počet úlomkov atď.),

— pozorovania počas testov citlivosti na mechanické podnety (napr. tvorba značného množstva dymu alebo úplné rozloženie bez zvukového efektu, plamene, iskry, zvuková rana, praskanie atď.),

— výsledky z každého typu testu,

— ak sa použil alternatívny prístroj, musí sa podať vedecké zdôvodnenie, ako aj dôkaz korelácie medzi výsledkami dosiahnutými so špecifikovaným prístrojom a výsledkami dosiahnutými s ekvivalentným prístrojom,

▼B

— všetky nepostrádateľné poznámky ako odkazy na testy s podobnými produktmi, ktoré by mohli byť dôležité pre správnu interpretáciu výsledkov,

— všetky doplnkové poznámky a pripomienky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

3.2. INTERPRETÁCIA A VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Správa z testu by sa mala zmieniť o všetkých výsledkoch, ktoré sa považujú za chybné, zavádzajúce, anomálne alebo nereprezentatívne. Ak sa ktorýkoľvek z výsledkov anuluje, treba uviesť vysvetlenie a nahradiť ho výsledkom alternatívneho doplnkového testu. Pokiaľ sa anomálny výsledok nedá vysvetliť, musí sa akceptovať ako normálna hodnota a musí sa podľa toho aj použiť na klasifikovanie príslušnej testovanej látky.

4. **ODKAZY**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods Tests and Criteria, 1990, United Nations, New York.

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

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

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

▼B

Dodatok

Príklad materiálovej špecifikácie pre test citlivosti na teplo (pozri technickú normu DIN 1623)

(1) Rúra: materiálová špecifikácia č. 1.0336.505 g.

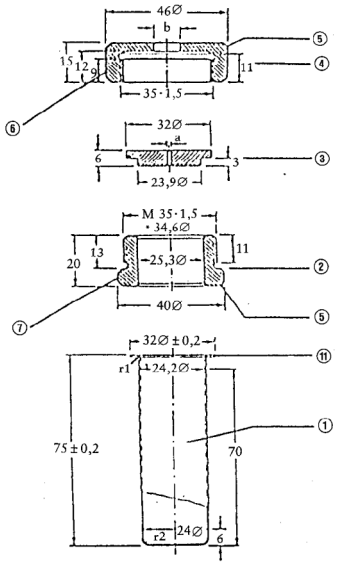
(2) Uzáverová doštička s otvorom: materiálová špecifikácia č. 1.4873.

(3) Závitový golier a matica: materiálová špecifikácia č. 1.3817.

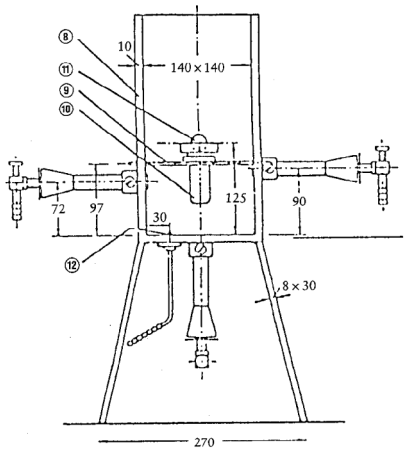
Obrázok 1

Testovací prístroj na stanovenie citlivosti na teplo

(všetky rozmery sú uvedené v milimetroch)



Obr. 1a Oceľová rúra a príslušenstvo



Obr. 1b Zohrievacie a ochranné zariadenie

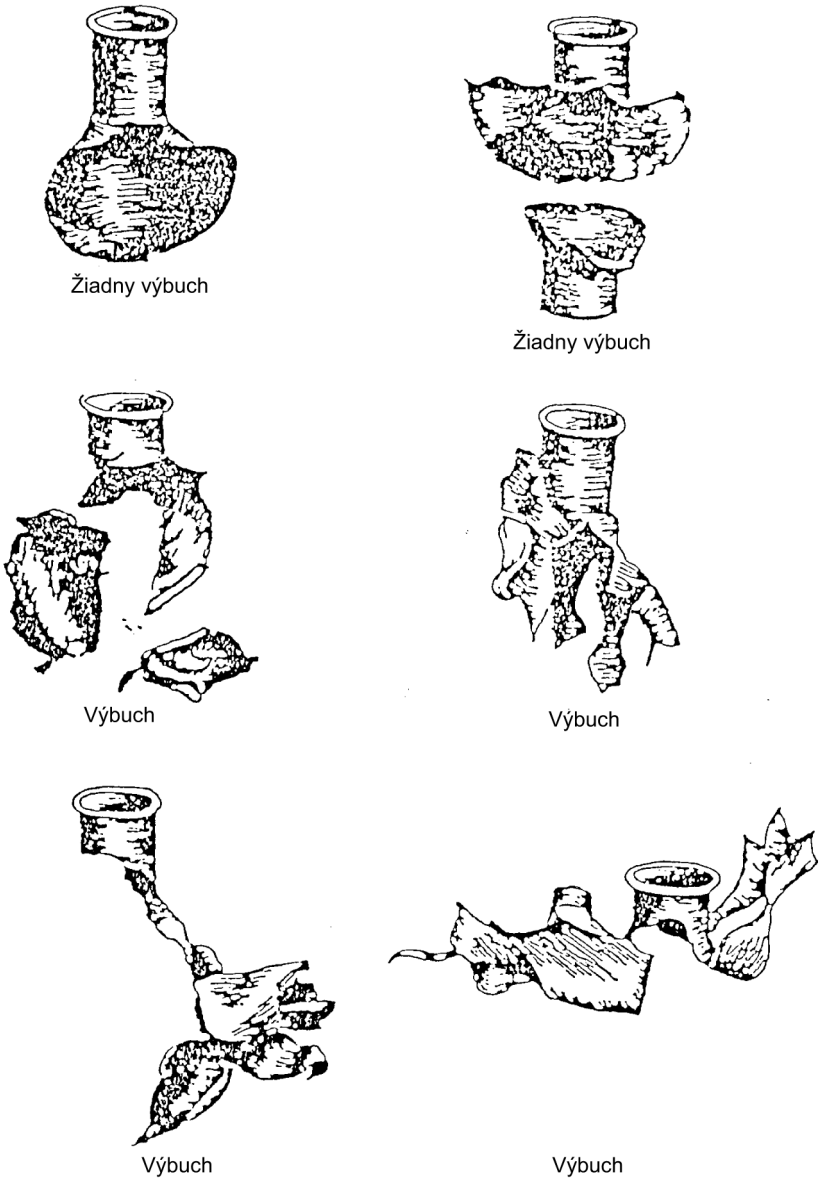
1. rúra
1. a) vonkajšia príruba
2. závitový golier; závit s nízkym trením
3. úzáverová doštička s otvorom s priemerom a = 2,0 alebo 6,0 mm
4. matica s otvorom s priemerom b = 10 mm
5. skosený povrch
6. 2 rovné plôšky pre kľúč na matice veľkosti 41
7. 2 rovné plôšky pre kľúč na matice veľkosti 36
8. ochranné puzdro odolné voči črepinám
9. 2 oporné tyče pre rúru
10. zmontovaná rúra
11. poloha zadného horáka; ostatné horáky sú viditeľné
12. zapaľovacia dýza

▼B

Obrázok 2

Test citlivosti na teplo

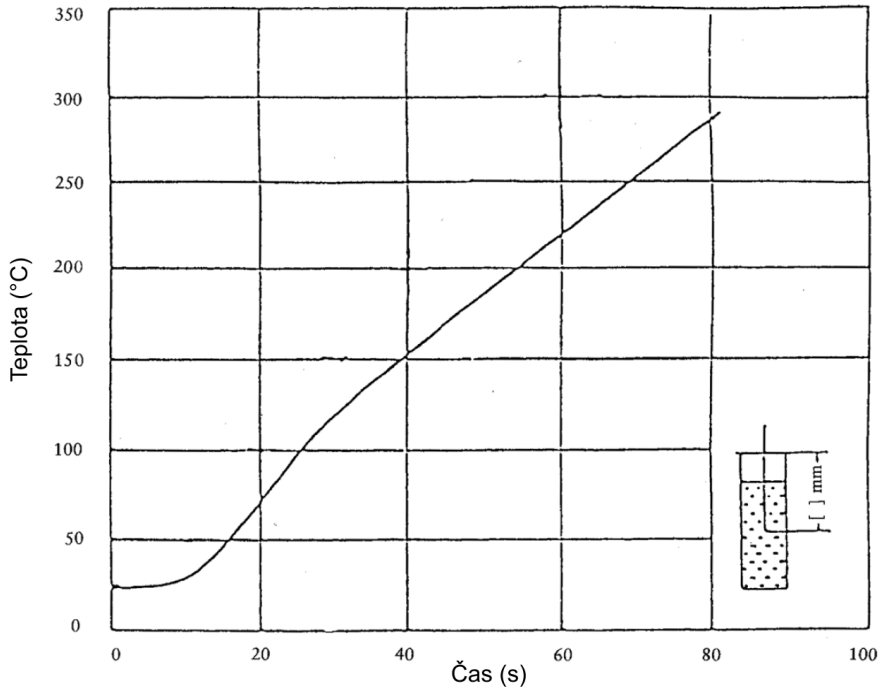
(príklady trieštenia)



▼B

Obrázok 3

Kalibrácia rýchlosti ohrevu pre test citlivosti na teplo



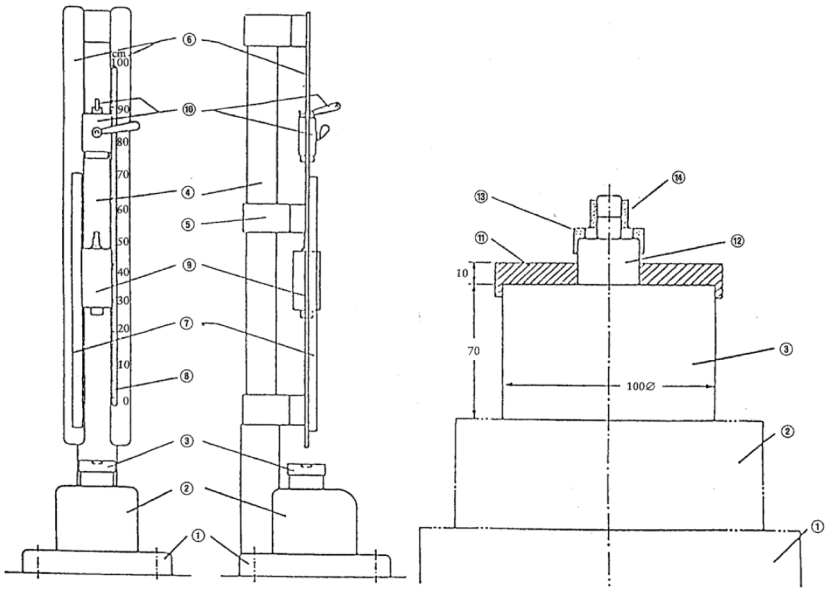
Krivka teploty a času dosiahnutá zohrievaním dibutylftalátu (27 cm^5) v uzavretej rúre (uzáverová doštička s otvorom 1,5 mm) pri nastavení prietoku propánu na 3,2 l/min. Teplota sa meria Cr-Al termočlánkom s priemerom 1 mm uloženým v ochrannom plášti z nehrdzavejúcej ocele, umiestneným centrálne 43 mm pod okrajom rúry. Rýchlosť ohrevu medzi 135 °C a 285 °C by mala byť medzi 185 a 215 K/min.

▼B

Obrázok 4

Prístroj na testovanie citlivosti látok na náraz

(všetky rozmery sú uvedené v milimetroch)



Obr. 4a Padací buchar, nárys a bokorys, celkový pohľad

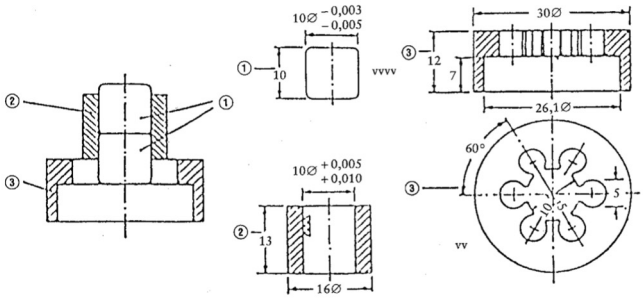
Obr. č. 4b Padací buchar, spodná časť (detail)

1. Základňa 450 × 450 × 60
2. Oceľový blok 230 x 250 x 200
3. Nákova, Ø 100 x 70
4. Stojan
5. Stredná priečka
6. Dve vodiace lišty
7. Ozubená tyč
8. Delená stupnica
9. Padací buchar
10. Upínacie spúšťacie zariadenie
11. Umiestňovacia platňa
12. Vložená nákova (vymeniteľná), ø 26 × 26
13. Umiestňovací krúžok s otvormi
14. Nárazový mechanizmus

▼B

Obrázok 4

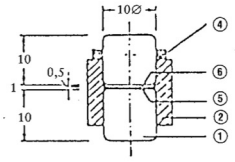
Pokračovanie

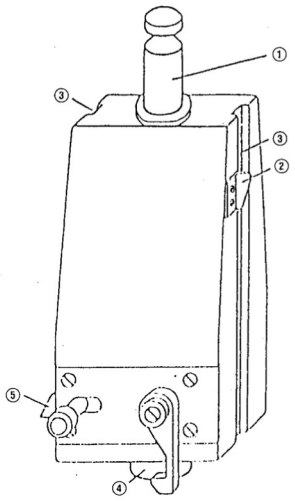


Obr. 4 c Nárazový mechanizmus pre chemické látky v práškovej alebo pastovitej forme

Obr. 4 d Nárazový mechanizmus pre kvapalné látky

1. Oceľové valce
2. Vodiace krúžky pre oceľové valce
3. Umiestňovací krúžok s otvormi:
   a) Zvislý rez
   b) Pôdorys
4. Gumový krúžok
5. Kvapalná chemická látka (40 mm^3)
6. Priestor bez prítomnosti kvapaliny





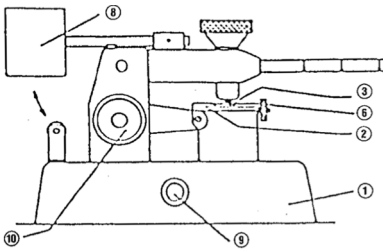
Obr. 4 e Buchar (padacie závažie hmotnosti 5 kg)

1. Závesný kolík
2. Označovač výšky
3. Polohovacia drážka
4. Valcovitá nárazová hlava
5. Príchytka (uzáver)

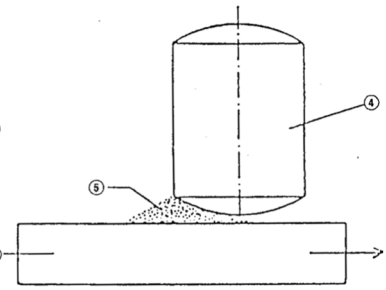
▼B

Obrázok 5

Prístroj na testovanie citlivosti látok na trenie



Obr. 5a Nárys a pôdorys



Obr. 5b Východisková poloha kolíka na vzorke

1. Oceľová základňa
2. Pohyblivý suport
3. Porcelánová doštička, 25 × 25 × 5 mm
4. Uchytený porcelánový kolík, priemer 10 × 15 mm
5. Testovaná vzorka, približné množstvo 10 mm^3
6. Držiak kolíka
7. Zaťažovacie rameno
8. Vyvažovacie rameno
9. Spínač
10. Koleso na nastavenie suportu do východiskovej polohy
11. Pripojenie na elektromotor

▼B

A.15. **TEPLOTA SAMOVZNIETENIA (KVAPALINY A PLYNY)**

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Výbušné látky a látky, ktoré sa samovoľne vznecujú v kontakte so vzduchom pri teplote okolitého prostredia, by sa nemali predkladať na testovanie touto metódou. Tento testovací postup sa dá použiť v prípade plynov, kvapalín a pár, ktoré sa môžu zapáliť za prítomnosti vzduchu horúcim povrchom.

Teplota samovznietenia sa môže do značnej miery redukovať prítomnosťou katalytických prímesí, povrchovým materiálom alebo väčším objemom skúšobnej nádoby.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Miera schopnosti látky samovoľne sa vznietiť sa vyjadruje teplotou samozápalu. Teplota samovznietenia predstavuje najnižšiu teplotu, pri ktorej sa testovaná látka vznieti, keď je zmiešaná so vzduchom za podmienok definovaných v skúšobnej metóde.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky sú citované v technických normách (pozri 1.6.3). V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

1.4. PRINCÍP METÓDY

Metóda stanovuje minimálnu teplotu vnútorného povrchu uzavretého priestoru, ktorá bude mať za následok vznietenie plynu, pary alebo kvapaliny vstreknutej do tohto uzavretého priestoru.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Opakovateľnosť sa mení v závislosti od rozmedzia teplôt samovznietenia a použitej skúšobnej metódy.

Citlivosť a špecifickosť závisia od použitej skúšobnej metódy.

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Prístroje**

Prístroj je opísaný v metóde uvedenej v 1.6.3.

1.6.2. **Podmienky skúšania**

Vzorka testovanej látky sa testuje podľa metódy uvedenej v 1.6.3.

1.6.3. **Realizácia testu**

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

▼B

2. **ÚDAJE**

V rámci testu sa zaznamenáva testovacia teplota, atmosférický tlak, množstvo testovanej vzorky a časové oneskorenie po moment, keď dôjde k vznieteniu.

3. **SPRÁVA**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

— presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímesi),

— množstvo použitej vzorky, atmosférický tlak,

— použitý prístroj,

— výsledky meraní (skúšobné teploty, výsledky týkajúce sa vznietenia, zodpovedajúce časy oneskorenia),

— všetky doplnkové poznámky a pripomienky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

4. **ODKAZY**

Žiadne.

▼B

A.16. **RELATÍVNA TEPLOTA SAMOVZNIETENIA PRE TUHÉ LÁTKY**

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Výbušné látky a látky, ktoré sa vznecujú spontánne v kontakte so vzduchom pri teplote okolitého prostredia, by sa nemali testovať touto metódou.

Účelom tohto testu je poskytnúť predbežné informácie o samozápalnosti tuhých látok pri zvýšených teplotách.

Ak sa teplo vyvinuté buď reakciou látky s kyslíkom, alebo exotermickým rozkladom nerozptýli dostatočne rýchlo do okolitého priestoru, dochádza k samozahriatiu, ktoré má za následok samovznietenie. K samovznieteniu preto dochádza vtedy, keď rýchlosť tvorby tepla presiahne rýchlosť straty tepla.

Testovací postup má význam ako predbežný skríningový test pre tuhé látky. Z hľadiska komplexného charakteru vznietenia a horenia tuhých látok by sa teplota samovznietenia stanovená podľa tejto metódy mala použiť iba na účely porovnania.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Teplota samovznietenia získaná touto metódou predstavuje minimálnu teplotu okolitého prostredia vyjadrenú v ^{o}C, pri ktorej sa za definovaných podmienok vznieti určitý objem látky.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP METÓDY

Určitý objem látky určenej na testovanie sa umiestni do piecky pri teplote miestnosti; zaznamená sa krivka teploty a času, vzťahujúca sa na podmienky v strede testovanej vzorky, pričom teplota piecky sa pri rýchlosti ohrevu 0,5 ^{o}C za minútu zvýši na 400 ^{o}C, alebo na teplotu topenia, ak je táto nižšia. Na účely tohto testu sa teplota piecky, pri ktorej teplota testovanej vzorky dosiahne 400 ^{o}C samozahriatím, nazýva teplotou samovznietenia.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Prístroje**

1.6.1.1. *Piecka*

Laboratórna piecka s programovateľnou teplotou (s objemom približne 2 litre), vybavená prirodzenou cirkuláciou vzduchu a dekompresným mechanizmom na tlmenie účinkov výbuchu. Aby sa zabránilo potenciálnemu nebezpečiu výbuchu, musí sa dávať pozor, aby sa rozkladové plyny nedostali do kontaktu s prvkami elektrického vyhrievania.

▼B

1.6.1.2. *Kocka z drôtenej siete*

Podľa šablóny zobrazenej na obrázku 1 treba vystrihnúť kúsok drôtenej siete s otvormi 0,045 mm, vyrobenej z nehrdzavejúcej ocele. Potom treba sieť poskladať do tvaru kocky s otvorenou vrchnou stranou a zaistiť drôtom.

1.6.1.3. *Tepelné články (termočlánky)*

Vhodné tepelné články (termočlánky).

1.6.1.4. *Registračný prístroj*

Ľubovoľný dvojkanálový registračný prístroj kalibrovaný od 0 °C do 600 °C alebo na zodpovedajúce napätie.

1.6.2. **Podmienky skúšania**

Látky sa testujú v takom stave, v akom boli získané.

1.6.3. **Realizácia testu**

Kocka sa naplní testovanou látkou a táto sa jemne utlačí, potom sa pridá viac testovanej látky, táto sa znova jemne utlačí a postup sa opakuje až dovtedy, kým kocka nie je úplne naplnená. Kocka sa potom zavesí do stredu piecky pri teplote miestnosti. Jeden termočlánok sa umiestni do stredu kocky a druhý medzi kocku a stenu piecky, aby zaznamenával teplotu piecky.

Počas zvyšovania teploty piecky rýchlosťou 0,5 °C za minútu na 400 °C alebo na teplotu topenia, ak je táto nižšia, sa plynulo zaznamenáva teplota piecky a teplota testovanej vzorky.

Keď sa testovaná látka vznieti (zapáli), termočlánok vzorky ukáže veľmi silný nárast teploty nad teplotu piecky.

2. **ÚDAJE**

Teplota piecky, pri ktorej teplota testovanej vzorky dosiahne hodnotu 400 °C samozahriatím, je dôležitá pre vyhodnotenie (obrázok 2).

3. **SPRÁVA**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

— opis testovanej látky,

— výsledky merania vrátane krivky teploty/času,

— všetky doplnkové poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

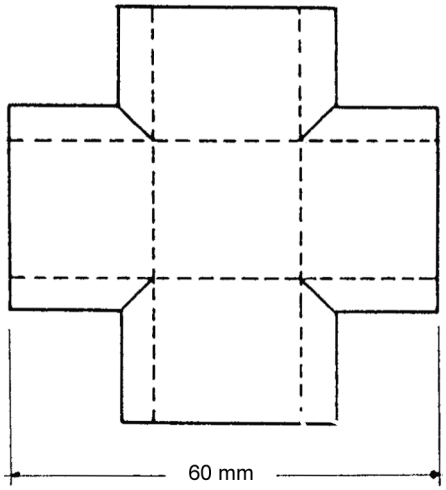
4. **ODKAZY**

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

▼B

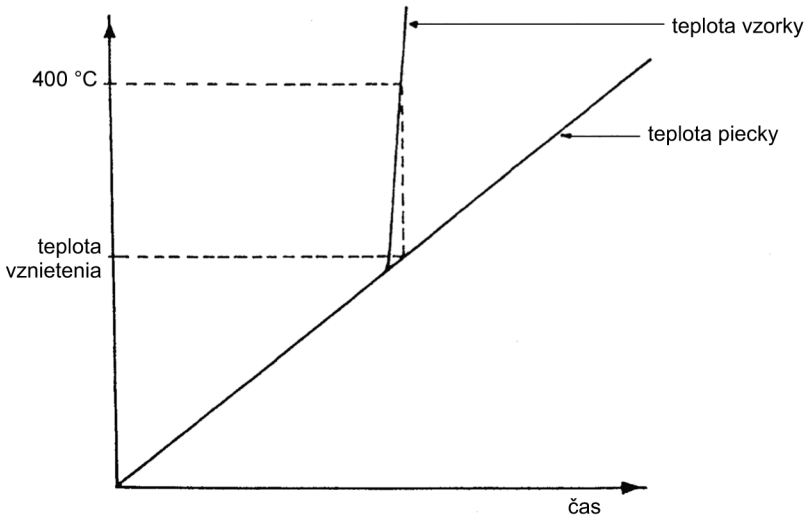
Obrázok 1

Schéma 20 mm testovanej kocky



Obrázok 2

Typická krivka teploty/času



▼B

A.17. OXIDAČNÉ VLASTNOSTI (TUHÉ LÁTKY)

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Odporúča sa získať predbežné informácie o všetkých potenciálne výbušných vlastnostiach látky ešte pred uskutočnením testu.

Tento test sa nedá použiť pre kvapaliny, plyny, výbušné ani mimoriadne horľavé látky, ani pre organické peroxidy.

Tento test sa nemusí uskutočniť, ak preskúmanie štrukturálneho vzorca potvrdí domnienku, že príslušná látka nie je schopná exotermickej reakcie s horľavým materiálom.

Aby sa zistilo, či sa test musí uskutočniť so zvláštnymi bezpečnostnými opatreniami, treba vykonať predbežný test.

1.2. POJEM A JEDNOTKY

Čas horenia: čas reakcie vyjadrený v sekundách, potrebný na to, aby reakčná zóna prešla celou hranicou vytvorenou z testovanej látky pri dodržaní postupu opísaného v 1.6.

Rýchlosť horenia: vyjadrená v milimetroch za sekundu.

Maximálna rýchlosť horenia: najvyššia hodnota rýchlostí horenia získaná so zmesami obsahujúcimi 10 až 90 hmotnostných percent oxidantu.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Pre potreby hlavného aj predbežného testu sa ako referenčná látka používa dusičnan bárnatý.

Referenčnou zmesou je tá zmes dusičnanu bárnatého s práškovou celulózou, pripravená podľa 1.6, ktorá dosiahla najvyššiu rýchlosť horenia (zvyčajne je to zmes obsahujúca 60 hmotnostných percent dusičnanu bárnatého).

1.4. PRINCÍP METÓDY

V záujme bezpečnosti sa uskutočňuje predbežný test. Ak tento test jasne ukáže, že testovaná látka má oxidačné vlastnosti, nie je potrebné uskutočniť žiadne ďalšie testy. Ak to však nie je tak, látku treba podrobiť kompletnému testu.

V rámci kompletného testu sa látka určená na testovanie zmieša s definovanou horľavinou v rozličných pomeroch. Každá zmes sa potom sformuje do hranice, ktorá sa na jednom konci zapáli. Najvyššia stanovená, resp. zistená, rýchlosť horenia sa porovná s maximálnou rýchlosťou horenia referenčnej zmesi.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Ak je to nutné, možno použiť akúkoľvek metódu drvenia, mletia alebo miešania za predpokladu, že rozdiel v maximálnej rýchlosti horenia v šiestich samostatných testoch sa nebude odchyľovať od aritmetickej strednej hodnoty o viac ako 10 %.

▼B

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Príprava**

1.6.1.1. *Testovaná látka*

Veľkosť čiastočiek testovanej látky treba redukovať na < 0,125 mm použitím tohto postupu: testovaná látka sa preoseje, zvyšná časť (frakcia) sa pomelie a tento postup sa opakuje dovtedy, kým celé množstvo určené na testovanie neprepadlo cez sito.

Použiť možno akúkoľvek metódu mletia a preosievania, ktorá zodpovedá kritériám kvality.

Pred prípravou zmesi sa látka určená na testovanie suší pri teplote 105 °C dovtedy, kým sa nedosiahne konštantná hmotnosť. Ak je teplota rozkladu látky určenej na testovanie nižšia ako 105 °C, látka sa musí sušiť pri vhodnej nižšej teplote.

1.6.1.2. *Horľavina*

Ako horľavina sa používa prášková celulóza. Celulóza musí byť takého typu, aký sa používa v prípade chromatografie tenkej vrstvy alebo stĺpcovej chromatografie. Ako najvhodnejší sa osvedčil typ s vyše 85 % podielom dĺžky vlákien medzi 0,020 mm a 0,075 mm. Celulózový prášok sa preoseje cez sito veľkosti 0,125 mm. Počas celého testu treba používať tú istú várku celulózy.

Pred prípravou zmesi sa prášková celulóza suší pri teplote 105 °C dovtedy, kým sa nedosiahne konštantná teplota.

Ak sa v predbežnom teste použije drevitá múčka, treba pripraviť drevitú múčku z mäkkého dreva použitím tej časti materiálu, ktorá sa preosiala cez otvory sita veľkosti 1,6 mm, potom treba múčku dôkladne premiešať, sušiť pri teplote 105 °C štyri hodiny v navrstvení maximálne do výšky 25 mm. Materiál treba ochladiť a uskladniť vo vzduchotesnom obale naplnenom do maximálnej možnej miery až do času použitia, podľa možnosti do 24 hodín od ukončenia procesu sušenia.

1.6.1.3. *Zápalný zdroj*

Ako zápalný zdroj sa odporúča použiť plynový horák s horúcim plameňom (minimálny priemer 5 mm). V prípade, ak sa použije iný zápalný zdroj (napríklad pri testovaní v inertnej atmosfére), v správe sa musí uviesť jeho opis a zdôvodnenie jeho použitia.

1.6.2. **Realizácia testu**

Poznámka:

Zmesi oxidantov s celulózou alebo drevitou múčkou sa musia upravovať ako potenciálne výbušné látky a musí sa s nimi narábať s patričnou opatrnosťou.

1.6.2.1. *Predbežný test*

Vysušená látka sa dôkladne premieša s vysušenou celulózou alebo drevitou múčkou v hmotnostnom pomere 2 dielov testovanej látky a 1 dielu celulózy alebo drevitej múčky, zmes sa potom sformuje do malej hranice kónického tvaru s rozmermi 3,5 cm (priemer základne) × 2,5 cm (výška) naplnením (nie utláčaním) formy kónického tvaru (napr. skleného laboratórneho lievika s upchatou stopkou).

▼B

Hranica sa umiestni na chladnú, nehorľavú (ohňovzdornú), nepórovitú základovú platňu s nízkou tepelnou vodivosťou. Test sa musí uskutočniť v digestore, ako je to uvedené v 1.6.2.2.

Zápalný zdroj sa kontaktne priloží ku kužeľu. Pozoruje sa a zaznamená prudkosť a trvanie výslednej reakcie.

Testovanú látku treba považovať za oxidačnú, ak je reakcia prudká.

V každom takom prípade, kde sú pochybnosti o dosiahnutom výsledku, je potrebné uskutočniť kompletný hlavný test podľa opisu uvedeného nižšie.

1.6.2.2. *Hlavný test*

Pripravia sa zmesi oxidantu a celulózy obsahujúce 10 až 90 hmotnostných percent oxidantu v 10 % prírastkoch. Pre hraničné prípady treba použiť zmesi s rovnakým hmotnostným podielom oxidantu a celulózy, aby sa dosiahla presnejšia hodnota maximálnej rýchlosti horenia.

Hranica sa vytvorí pomocou formy. Forma je vyrobená z kovu, má dĺžku 250 mm a trojuholníkovitý prierez s vnútornou výškou 10 mm a vnútornou šírkou 20 mm. Po obidvoch stranách formy sú v pozdĺžnom smere namontované kovové lišty, ktoré slúžia ako bočné ohraničenie a ktoré prečnievajú 2 mm ponad vrchný okraj trojuholníkovitého prierezu (pozrite obrázok). Žliabok s trojuholníkovitým prierezom sa zvoľna naplní mierne nad okraj testovanou zmesou. Forma sa potom zdvihne do výšky 2 cm a pustí sa, aby dopadla na tvrdý podklad, čím sa zmes utrasie. Prebytočná zmes sa zhrnie šikmo nakloneným plátkom. Odstránia sa bočné kovové lišty a zostávajúci prášok sa uhladí použitím valčeka. Na vrchnú stranu formy sa potom položí nehorľavá (ohňovzdorná), nepórovitá podkladová doska s nízkou tepelnou vodivosťou, prístroj sa obráti spodnou časťou navrch a forma sa odstráni.

Hranica z práškovej zmesi sa umiestni do digestora priečne na smer prúdenia vzduchu.

Rýchlosť prúdenia vzduchu musí byť dostatočná na to, aby sa zabránilo úniku spalín do ovzdušia laboratória, a počas testu by sa nemala meniť. Okolo prístroja by mala byť postavená protiprievanová zástena.

Kvôli hygroskopickým vlastnostiam celulózy a niektorých látok určených na testovanie by sa testy mali uskutočniť čo možno najskôr po príprave.

Dotykom plameňa sa zapáli jeden koniec hranice z práškovej zmesi.

Po tom, čo sa zóna reakcie rozšírila na počiatočnú vzdialenosť v dĺžke 30 mm, treba odmerať čas reakcie na úseku ďalších 200 mm.

Test sa uskutoční s referenčnou látkou a najmenej raz s každým stanoveným hmotnostným pomerom zmesi testovanej látky a celulózy.

Ak sa zistí, že maximálna rýchlosť horenia je podstatne vyššia než v prípade referenčnej zmesi, test možno zastaviť. V ostatných prípadoch sa musí test opakovať päťkrát v prípade každej z troch zmesí, ktoré dosiahli najvyššiu rýchlosť horenia.

▼B

Ak vzniklo podozrenie, že výsledok je klamlivo pozitívny, test sa musí zopakovať s použitím inertnej látky namiesto celulózy, ale s podobnou veľkosťou častíc, napríklad diatomitu. Alternatívne sa musí zmes testovanej látky s celulózou, ktorá dosiahla najvyššiu rýchlosť horenia, opakovane testovať v inertnej atmosfére (< 2 % v/v obsahu kyslíka).

2. **ÚDAJE**

Z bezpečnostných dôvodov sa musí práve maximálna rýchlosť horenia – teda nie stredná hodnota – považovať za charakteristickú oxidačnú vlastnosť testovanej látky.

Pre vyhodnotenie je dôležitá najvyššia hodnota rýchlosti horenia danej zmesi v rámci šiestich testov.

Najvyššia hodnota rýchlosti horenia pre každú zmes oproti koncentrácii oxidantu sa nanesie na graf. Z grafu sa potom vyberie maximálna rýchlosť horenia.

Šesť nameraných hodnôt rýchlosti horenia v rámci jedného skúšobného kola, získaných zo zmesi s maximálnou rýchlosťou horenia, sa nesmie odchyľovať od hodnoty aritmetického stredu o viac ako 10 %, lebo inak bude potrebné zdokonaliť metódy drvenia, mletia a miešania testovanej látky.

Treba porovnať dosiahnutú maximálnu rýchlosť horenia s maximálnou rýchlosťou horenia referenčnej zmesi (pozri 1.3).

Ak sa testy uskutočňujú v inertnej atmosfére, maximálna rýchlosť reakcie sa porovná s maximálnou rýchlosťou reakcie referenčnej zmesi v inertnej atmosfére.

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

— identitu, zloženie, čistotu, obsah vlhkosti atď. testovanej látky,

— všetky úpravy testovanej vzorky (napr. drvenie, mletie, sušenie),

— druh zápalného zdroja použitého v teste,

— výsledky meraní,

— typ (formu) reakcie [napr. horenie plameňom na povrchu, horenie cez celú hmotu, všetky informácie týkajúce sa produktov (splodín) horenia (spalín) atď.],

— všetky doplnkové poznámky a pripomienky dôležité pre interpretáciu výsledkov vrátane opisu prudkosti reakcie (horenie plameňom, iskrenie, pomalé tlenie atď.) a približnej doby trvania v predbežnom bezpečnostnom/skríningovom teste pre testovanú, ako aj pre referenčnú látku,

— výsledky z testov s inertnou látkou, ak také existujú,

— výsledky z testov uskutočnených v inertnej atmosfére, ak také existujú.

▼B

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Látku treba považovať za oxidačnú vtedy, keď:

a) v predbežnom skríningovom teste došlo k prudkej reakcii;

b) v hlavnom teste je maximálna rýchlosť horenia testovanej zmesi vyššia alebo sa rovná maximálnej rýchlosti horenia referenčnej zmesi celulózy a dusičnanu bárnatého.

Aby sa predišlo nesprávnym pozitívnym výsledkom, pri interpretácii výsledkov sa musia zohľadniť aj výsledky získané pri testovaní látky zmiešanej s inertným materiálom a/alebo pri testovaní v inertnej atmosfére.

4. **ODKAZY**

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

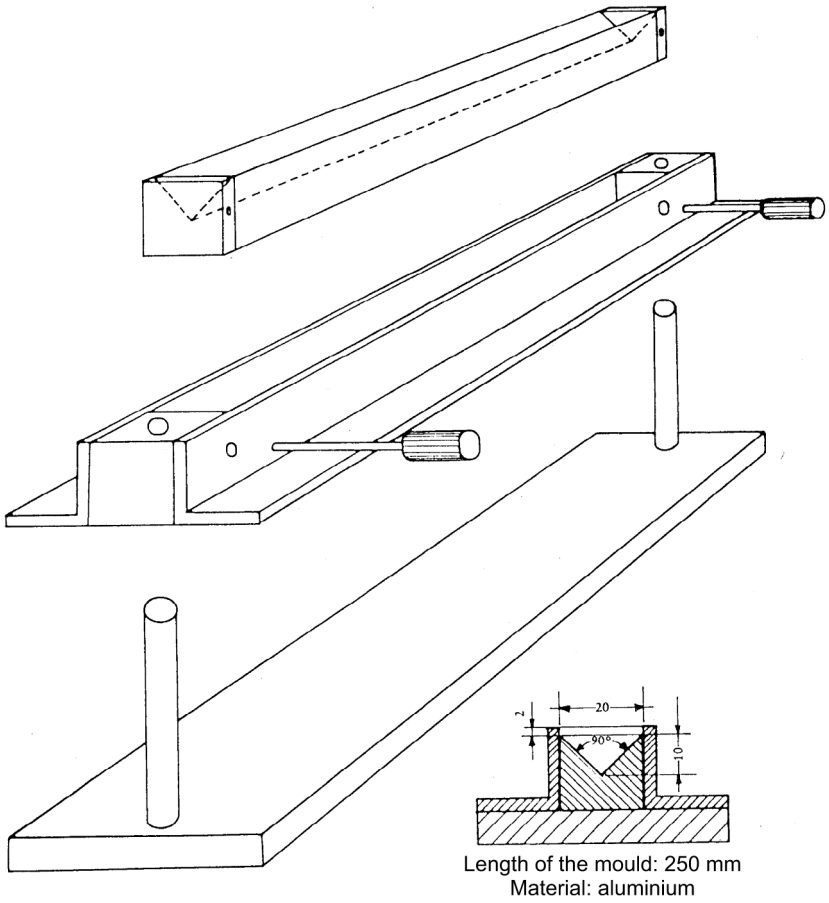
▼B

Dodatok

Obrázok

Forma a príslušenstvo na prípravu hranice z práškovitej skúšobnej látky

(všetky rozmery sú uvedené v milimetroch)



▼B

A.18. **ČÍSELNÁ PRIEMERNÁ MOLEKULOVÁ HMOTNOSŤ A DISTRIBÚCIA MOLEKULOVÝCH HMOTNOSTÍ POLYMÉROV**

1. **METÓDA**

Táto metóda, založená na gélovej permeačnej chromatografii, je prevzatá z OECD TG 118 (1996). Základné princípy a ďalšie technické informácie sú uvedené v odkaze (1).

1.1. ÚVOD

Vlastnosti polymérov sú veľmi rôznorodé, a nie je preto možné opísať jedinú metódu, ktorá by presne vymedzovala podmienky ich vzájomného oddeľovania a vyhodnocovania a ktorá by brala do úvahy všetky možnosti a špecifické situácie vyskytujúce sa pri separácii polymérov. Predovšetkým nie vždy sa dá pri komplexných polymérových systémoch použiť gélová permeačná chromatografia (GPC). Tam, kde nie je použitie GPC z praktického hľadiska možné, dajú sa molekulové hmotnosti stanoviť inými spôsobmi (pozri dodatok). V takýchto prípadoch je potrebné uviesť všetky podrobnosti a použitie konkrétnej metódy sa musí odôvodniť.

Opisovaná metóda je založená na norme DIN 55672 (1). Podrobné informácie o vykonaní pokusu a spôsobe vyhodnotenia údajov možno nájsť v uvedenej norme. Všetky zmeny, ktoré treba v metóde urobiť, musia byť odôvodnené. Možno použiť aj iné normy, no treba pri tom uviesť plný odkaz. Pri opisovanej metóde sa na kalibráciu používajú vzorky polystyrénu so známou polydosperzitou a možno ju modifikovať tak, aby bola vhodná pre určité polyméry, napríklad pre polyméry rozpustné vo vode a pre vetvené polyméry s dlhými reťazcami.

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Číselná priemerná molekulová hmotnosť M_n a hmotnostná priemerná molekulová hmotnosť M_w sa stanovili pomocou týchto rovníc:

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

kde:

H_i je hladina signálu detektora od základnej čiary pre retenčný objem V_i

M_i je molekulová hmotnosť polymérovej frakcie pri retenčnom objeme V_i a

n je počet dátových bodov.

Šírka distribúcie molekulových hmotností, ktorá je mierou disperzity systému, je daná pomerom M_w/M_n.

▼B

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

GPC je relatívna metóda, a preto je pri nej potrebné uskutočniť kalibráciu. Bežne sa na tento účel používajú lineárne skonštruované polystyrénové štandardy so známymi molekulovými hmotnosťami M_n a M_w a s úzkou oblasťou distribúcie molekulových hmotností. Kalibračnú krivku možno použiť na stanovenie molekulovej hmotnosti neznámej vzorky iba vtedy, ak sa pri separácii štandardov aj neznámej vzorky použijú úplne rovnaké podmienky.

Vzťahy stanovené medzi molekulovou hmotnosťou a elučným objemom sú platné iba pri špecifických podmienkach daného pokusu. Medzi tieto podmienky patria predovšetkým teplota, typ rozpúšťadla (alebo zmesi rozpúšťadiel), chromatografické podmienky a rozdeľovacia kolóna alebo systém kolón.

Takto stanovené molekulové hmotnosti vzoriek predstavujú pomerné hodnoty a označujú sa ako „molekulové hmotnosti polystyrénového ekvivalentu“. Znamená to, že v závislosti od štrukturálnych a chemických rozdielov medzi vzorkou a štandardmi sa môžu molekulové hmotnosti do väčšej alebo menšej miery od svojich absolútnych hodnôt odlišovať. Prípadné použitie iných štandardov, napríklad polyetylénglykolu, polyetylénoxidu, polymetylmetakrylátu alebo kyseliny polyakrylovej, je potrebné odôvodniť.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Distribúciu molekulových hmotností vzorky aj priemerné molekulové hmotnosti (M_n, M_w) možno stanoviť pomocou metódy GPC. Metóda GPC predstavuje osobitný typ kvapalinovej chromatografie, pri ktorej dochádza k rozdeleniu vzorky na základe hydrodynamických objemov jej jednotlivých zložiek (2).

K oddeľovaniu dochádza pri prechode vzorky cez kolónu, ktorá je naplnená poréznym materiálom, ktorým je zvyčajne organický gél. Malé molekuly cez póry prechádzajú, zatiaľ čo veľké molekuly sa z objemu gélu vylučujú. Dráha, ktorú prekonajú veľké molekuly, je preto kratšia a vylučujú sa ako prvé. Molekuly strednej veľkosti do niektorých pórov vnikajú a vylučujú sa z kolóny neskôr. Najmenšie molekuly s hydrodynamickým priemerom menším, ako je veľkosť pórov gélu, môžu vnikať do všetkých z nich a vylučujú sa ako posledné.

V ideálnych podmienkach závisí oddeľovanie výlučne od veľkosti jednotlivých molekúl, hoci v praxi je ťažké vyhnúť sa aspoň určitému stupňu interferencie absorpčných vplyvov. Situácia sa môže zhoršiť aj v dôsledku nerovnomerného naliatia kolóny a mŕtvych objemov (2).

Detekciu možno uskutočňovať napríklad pomocou merania indexu lomu alebo UV-absorpcie eluátov. Na základe takýchto údajov je možné zostrojiť jednoduchú distribučnú krivku. Aby však bolo možné prisúdiť bodom na distribučnej krivke molekulové hmotnosti, je potrebné kolónu najprv okalibrovať. Robí sa to tak, že na kolónu sa nanesú polyméry so známou molekulovou hmotnosťou, v ideálnom prípade aj s približne podobnou štruktúrou, napríklad rozličné polystyrénové štandardy. Zvyčajne sa získava gaussovská krivka, ktorá býva niekedy na strane nízkych molekulových hmotností mierne pretiahnutá. Zvislá os udáva hmotnostné množstvo jednotlivých typov molekúl vyplavených z kolóny, vodorovná os je vyjadrená ako dekadický logaritmus molekulovej hmotnosti.

▼B

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Reprodukovateľnosť (relatívna štandardná odchýlka, RSD) elučného objemu by mala byť lepšia ako 0,3 %. Ak sa chromatogram vyhodnocuje nezávisle od času a ak nespĺňa horeuvedené kritérium, potom je potrebné zabezpečiť reprodukovateľnosť analýzy pomocou vnútorného štandardu (1). Polydisperzita závisí od molekulových hmotností štandardov. V prípade polystyrénových štandardov sú typické hodnoty takéto:

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

(M_p je molekulová hmotnosť štandardu v maxime píku)

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. **Príprava štandardných roztokov polystyrénu**

Polystyrénové štandardy sa opatrným miešaním rozpustia vo zvolenom elučnom činidle. Pri príprave roztokov sa treba riadiť odporúčaniami výrobcov.

Voľba koncentrácií štandardov závisí od rozličných faktorov, napríklad od nanášacieho objemu, viskozity roztoku a citlivosti analytického detektora. Maximálny nanášací objem musí byť prispôsobený dĺžke kolóny, aby nedochádzalo k jej preťaženiu. Zvyčajné nanášacie objemy pri analytických separáciách pomocou GPC sa pri kolóne s rozmermi 30 cm × 7,8 mm pohybujú v rozmedzí 40 až 100 µl. Je možné použiť aj vyššie objemy, nemali by však presiahnuť 250 µl. Pred samotnou kalibráciou kolóny je potrebné určiť optimálny pomer medzi nanášacím objemom a koncentráciou nanášanej vzorky.

1.6.2. **Príprava roztoku vzorky**

V zásade rovnaké požiadavky sa vzťahujú aj na prípravu roztokov vzoriek. Vzorka sa opatrným potriasaním rozpustí vo vhodnom rozpúšťadle, napríklad v tetrahydrofuráne (THF). V žiadnom prípade ju nemožno rozpúšťať v ultrazvukovom kúpeli. V prípade potreby sa vzorka prečistí filtráciou cez membránový filter s veľkosťou pórov medzi 0,2 µm a 2 µm.

V záverečnej správe sa treba zmieniť o prítomnosti nerozpustených tuhých častíc, ktoré môžu byť dôsledkom prítomnosti vysokých molekulových hmotností. Percentuálne zastúpenie hmotnosti rozpustených čiastočiek je potrebné určiť pomocou primeranej metódy. Roztoky sa musia použiť do 24 hodín.

1.6.3. **Prístrojové vybavenie**

— nádrž na rozpúšťadlo,

— zariadenie na odplynenie kvapalín (ak je potrebné),

— čerpadlo,

▼B

— tlmič pulzov kvapaliny (ak je potrebný),

— nanášací systém,

— chromatografické kolóny,

— detektor,

— prietokomer (ak je potrebný),

— zariadenie na zaznamenávanie a spracúvanie údajov,

— nádoba na odpad.

Treba zabezpečiť inertnosť systému GPC voči používaným rozpúšťadlám (napríklad použitím oceľových kapilár, ak je rozpúšťadlo THF).

1.6.4. **Nanášací systém a systém na privádzanie rozpúšťadla**

Buď pomocou automatického nanášacieho zariadenia, alebo ručne sa na kolónu nanesie v ostro vymedzenej zóne presne definované množstvo roztoku vzorky. Príliš rýchle vytiahnutie striekačky alebo stlačenie jej piestu pri ručnom nanášaní vzorky môže spôsobiť zmeny v pozorovanej distribúcii molekulových hmotností. Systém na privádzanie rozpúšťadla by nemal spôsobovať pulzové vlny, čo možno v ideálnom prípad zabezpečiť zaradením tlmiča pulzov. Prietok sa pohybuje okolo hodnoty 1 ml/min.

1.6.5. **Kolóna**

V závislosti od vzorky možno polymér charakterizovať buď pomocou jedinej kolóny, alebo pomocou viacerých za sebou spojených kolón. Ako náplň kolóny je komerčne dostupných viacero poréznych materiálov s definovanými vlastnosťami (napríklad veľkosť pórov, limit vylučovania). Voľba separačného gélu a dĺžky kolóny závisí od vlastností vzorky (hydrodynamické objemy, distribúcia molekulových hmotností) aj od špecifických podmienok pri separácii, napríklad od typu rozpúšťadla, teploty a rýchlosti prietoku (1) (2) (3).

1.6.6. **Teoretické poschodia kolóny**

Kolóna alebo kombinácia viacerých kolón používaných pri separácii musí byť charakterizovaná počtom teoretických poschodí. V prípade THF ako rozpúšťadla sa to robí tak, že na kolónu so známou dĺžkou sa nanesie roztok etylbenzénu alebo iného vhodného nepolárneho rozpúšťadla. Počet teoretických poschodí udáva táto rovnica:

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

kde:

N = počet teoretických poschodí

V_e = elučný objem v maxime píku

▼B

W = šírka píku pri základnej čiare

$W_{1/2}$ = šírka píku v polovici jeho výšky

1.6.7. **Účinnosť separácie**

Okrem počtu teoretických poschodí, ktorý určuje šírku pásu, hrá pri separácii úlohu aj jej účinnosť, ktorá sa určuje na základe strmosti kalibračnej krivky. Účinnosť separácie kolóny možno získať z tohto vzťahu:

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

kde:

$V_{e,\ Mx}$ = elučný objem polystyrénu s molekulovou hmotnosťou M_x

$V_{e,(10.Mx)}$= elučný objem polystyrénu s desaťnásobne väčšou molekulovou hmotnosťou.

Rozlíšiteľnosť systému sa zvyčajne definuje takto:

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

kde:

V_{e1}, V_{e2} = elučné objemy dvoch polystyrénových štandardov v maxime píku

W_1, W_2 = šírky píkov pri základnej čiare

M_1, M_2 = molekulové hmotnosti v maxime píku (mali by sa líšiť o faktor 10)

R-hodnota kolóny musí byť vyššia ako 1.7 (4).

1.6.8. **Rozpúšťadlá**

Všetky rozpúšťadlá musia mať vysoký stupeň čistoty (pri THF je stupeň čistoty 99,5 %). Zásobník na rozpúšťadlo (v prípade potreby s atmosférou inertného plynu) musí byť dostatočne veľký, aby umožnil kalibráciu kolóny a analýzu niekoľkých vzoriek. Pred vháňaním do kolóny pomocou čerpadla treba rozpúšťadlo zbaviť plynov.

1.6.9. **Kontrola teploty**

Teplota kritických vnútorných zložiek systému (nanášacia slučka, detektor a hadičky) musí byť stála a musí zodpovedať zvolenému rozpúšťadlu.

▼B

1.6.10. **Detektor**

Účelom detektora je kvantitatívne zaznamenávanie koncentrácie vzorky, ktorá sa eluuje z kolóny. V záujme eliminácie zbytočného rozširovania píku by mala mať kyveta meracej komôrky detektora čo možno najmenší objem. S výnimkou detektorov založených na rozptyle svetla a viskozitných detektorov by nemal tento objem presahovať 10 µl. Ako detekčná metóda sa zvyčajne používa diferenciálna refraktometria. V závislosti od osobitných požiadaviek vzorky alebo elučného činidla však možno použiť aj iné typy detektorov, napríklad UV/VIS, IR, viskozitný detektor atď.

2. **ÚDAJE A PRÍPRAVA TESTOVACEJ SPRÁVY**

2.1. ÚDAJE

Podrobné vyhodnocovacie kritériá a požiadavky vzťahujúce sa na zber a spracúvanie údajov sú uvedené v norme DIN (1).

Pri každej vzorke je potrebné uskutočniť dva nezávislé pokusy. Každý z nich treba analyzovať osobitne.

Pri každom meraní treba udať M_n, M_w, M_w/M_n a M_p. Treba výslovne uviesť, že namerané hodnoty sú pomerné hodnoty ekvivalentné použitým štandardom.

Po stanovení retenčných objemov alebo retenčných časov (podľa možnosti korigovaných použitím vnútorného štandardu) sa voči jednej z týchto hodnôt nanášajú do grafu hodnoty log M_p (M_p je maximum píku kalibračného štandardu). Na každú dekádu molekulových hmotností treba použiť aspoň dva kalibračné body, na zostrojenie celej kalibračnej krivky, ktorá by mala pokrývať odhadnutú molekulovú hmotnosť vzorky, je potrebných aspoň päť bodov. Koncový bod kalibračnej krivky v oblasti nízkych molekulových hmotností sa definuje pomocou n-hexylbenzénu alebo iného vhodného nepolárneho rozpúšťadla. Číselné priemerné a hmotnostné priemerné molekulové hmotnosti sa vo všeobecnosti stanovujú pomocou elektronického spracúvania údajov, založeného na vzorcoch uvedených v časti 1.2. V prípade manuálnej digitalizácie sa možno riadiť dokumentom ASTM D 3536-91 (3).

V prípade zadržania každého nerozpustného polyméru v kolóne je vysoko pravdepodobné, že jeho molekulová hmotnosť je vyššia ako molekulová hmotnosť rozpustnej frakcie. Výsledkom nevzatia tejto skutočnosti do úvahy môže byť nadhodnotenie zastúpenia zložiek s nízkou molekulovou hmotnosťou. Návod na uskutočnenie korekcie obsahu zložiek s nízkou molekulovou hmotnosťou na nerozpustný polymér je uvedený v dodatku.

2.2. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať tieto informácie:

2.2.1. **Testovaná látka:**

— dostupné informácie o testovanej látke (totožnosť, prísady, nečistoty/prímesi),

▼B

— postup spracovania vzorky, zistené skutočnosti, problémy.

2.2.2. **Prístroje a zariadenia:**

— zásobník na elučné činidlo, inertný plyn, zariadenie na odplynenie elučného činidla,

— zloženie elučného činidla, nečistoty/prímesi,

— čerpadlo, tlmič pulzov kvapaliny, nanášací systém, rozdeľovacie kolóny (výrobca, všetky informácie o charakteristikách kolón, ako sú veľkosť pórov, druh separačného materiálu atď., počet, dĺžka a usporiadanie použitých kolón),

— počet teoretických poschodí kolóny (alebo kombinácie kolón), účinnosť rozdeľovania (rozlišovacia schopnosť systému),

— informácie o symetrii píkov,

— teploty kolóny, spôsob kontroly teploty,

— detektor (princíp merania, typ, objem meracej kyvety),

— prietokomer, ak sa používa (výrobca, princíp merania),

— systém na zaznamenávanie a spracúvanie údajov (hardvér a softvér).

2.2.3. **Kalibrácia systému:**

— podrobný opis metódy použitej na zostrojenie kalibračnej krivky,

— informácie o kritériách kvality tejto metódy (napríklad korelačný koeficient, odchýlka súčtu štvorcov atď.),

— informácie o všetkých extrapoláciách, predpokladoch a aproximáciách, ktoré sa uskutočnili počas priebehu pokusu, a o vyhodnocovaní a spracúvaní údajov,

— všetky merania, ktoré boli použité na zostrojenie kalibračnej krivky musia byť zdokumentované v tabuľke, ktorá obsahuje pre každý bod merania tieto informácie:

  — názov vzorky,

  — výrobcu vzorky,

  — charakteristické hodnoty štandardov, t. j. M_p, M_n, M_w a M_w/M_n, tak ako ich uvádza výrobca alebo ako boli odvodené z následných meraní, a tiež podrobnosti o metóde stanovenia,

  — nanášací objem a koncentráciu nanesenej vzorky,

▼B

— hodnotu M_p, ktorá bola použitá na kalibráciu,

— elučný objem alebo opravený retenčný čas, nameraný pri maxime píku,

— M_p vypočítaná v maxime píku,

— percentuálna odchýlka vypočítanej hodnoty M_p od kalibračnej krivky.

2.2.4. **Vyhodnotenie:**

— vyhodnotenie na základe času: metódy použité na zabezpečenie požadovanej reprodukovateľnosti (korekčná metóda, vnútorné štandardy atď.),

— informácia o tom, či bolo vyhodnotenie vykonané na základe elučného objemu alebo retenčného času,

— informácie o limitoch vyhodnocovania, ak nebola vykonaná úplná analýza píku,

— opis vyrovnávacej/prekladacej metódy, ak sa pri grafickom vyhodnocovaní použila,

— príprava a predbežné spracovanie vzorky,

— prítomnosť nerozpustených čiastočiek, ak boli pozorované,

— objem (μl) a koncentrácia (mg/ml) nanesenej vzorky,

— opis vplyvov, ktoré mohli spôsobiť odchýlku od ideálneho GPC profilu,

— podrobný opis modifikácií uskutočnených v testovacej metóde,

— podrobnosti o rozsahu chýb merania,

— všetky iné informácie a pozorované skutočnosti, ktoré by mohli byť významné z hľadiska interpretácie výsledkov.

3. **ODKAZY**

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

(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

Dodatok

Príklad ďalších metód na stanovenie číselnej priemernej molekulovej hmotnosti (M_n) polymérov

Prednostnou metódou na stanovenie M_n je gélová permeačná chromatografia (GPC), najmä ak je k dispozícii séria štandardov so štruktúrou podobnou štruktúre stanovovaného polyméru. V prípadoch, v ktorých je použitie GPC sprevádzané praktickými problémami, alebo ak je vopred známe, že polymér nespĺňa regulačné kritérium pre M_n, sú k dispozícii náhradné metódy ako napríklad:

1. **Využitie koligatívnych vlastností**

1.1. Ebulioskopia/kryoskopia:

meria sa zvyšovanie bodu varu (ebulioskopia) alebo znižovanie bodu tuhnutia (kryoskopia) rozpúšťadla, do ktorého sa pridáva polymér. Metóda je založená na skutočnosti, že vplyv rozpusteného polyméru na bod varu/tuhnutia kvapaliny závisí od jeho molekulovej hmotnosti (1) (2).

Použiteľnosť: $M_n < 20\,000$.

1.2. Znižovanie tlaku pár:

pri tejto metóde sa meria tlak pár zvolenej referenčnej kvapaliny pred a po pridaní známych množstiev polyméru (1) (2).

Použiteľnosť: $M_n < 20\,000$ (teoreticky; v praxi je užitočnosť metódy obmedzená).

1.3. Membránová osmometria:

metóda využíva princíp osmózy, t. j. prirodzený sklon molekúl rozpúšťadla prechádzať cez polopriepustnú membránu zo zriedeného do koncentrovaného prostredia až po dosiahnutie rovnováhy. Pri pokuse má zriedený roztok nulovú koncentráciu a koncentrovaný roztok obsahuje polymér. Prechádzaním rozpúšťadla vzniká rozdiel tlaku, ktorého veľkosť závisí od koncentrácie a molekulovej hmotnosti polyméru (1) (3) (4).

Použiteľnosť: M_n medzi 20 000 – 200 000.

1.4. Osmometria v plynnej fáze:

pri tejto metóde sa porovnáva rýchlosť odparovania čistého aerosólu rozpúšťadla s rýchlosťou odparovania najmenej troch aerosólov obsahujúcich rozličné koncentrácie polyméru (1) (5) (6).

Použiteľnosť: $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Analýza koncovej skupiny**

Na použitie tejto metódy je potrebné poznať celkovú štruktúru polyméru a aj povahu skupín nachádzajúcich sa na konci reťazcov (tieto skupiny musia byť od hlavného reťazca polyméru odlíšiteľné napríklad pomocou NMR alebo titrácie/derivatizácie). Zo stanovenia molekulárnej koncentrácie koncových skupín, ktoré sa nachádzajú v polyméri, možno vypočítať hodnotu molekulovej hmotnosti (7) (8) (9).

Použiteľnosť: M_n do 50 000 (s klesajúcou spoľahlivosťou).

3. **Odkazy**

(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, 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: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

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

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

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

▼B

A.19. OBSAH ZLOŽIEK S NÍZKOU MOLEKULOVOU HMOTNOSŤOU V POLYMÉROCH

1. METÓDA

Táto metóda, založená na gélovej permeačnej chromatografii, je prevzatá z OECD TG 119 (1996). Základné princípy a ďalšie technické informácie sú uvedené v literárnych odkazoch.

1.1. ÚVOD

Vlastnosti polymérov sú veľmi rôznorodé, a nie je preto možné opísať jedinú metódu, ktorá by presne vymedzovala podmienky ich separácie a vyhodnocovania a ktorá by brala do úvahy všetky možnosti a špecifické situácie vyskytujúce sa pri separácii polymérov. Predovšetkým nie vždy možno pri komplexných polymérových systémoch použiť gélovú permeačnú chromatografiu (GPC). Tam, kde nie je použitie GPC z praktického hľadiska možné, dajú sa molekulové hmotnosti stanoviť inými spôsobmi (pozri dodatok). V takýchto prípadoch je potrebné uviesť všetky podrobnosti a použitie konkrétnej metódy treba odôvodniť.

Opisovaná metóda je založená na norme DIN 55672 (1). Podrobné informácie o vykonaní pokusu a spôsobe vyhodnotenia údajov možno nájsť v uvedenej norme. Všetky zmeny, ktoré treba v metóde urobiť, musia byť odôvodnené. Možno použiť aj iné normy, no treba pri tom uviesť plný literárny odkaz. Pri opisovanej metóde sa na kalibráciu používajú vzorky polystyrénu so známou polydisperzitou a možno ju modifikovať tak, aby bola vhodná pre určité polyméry, napríklad pre polyméry rozpustné vo vode a vetvené polyméry s dlhými reťazcami.

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Nízka molekulová hmotnosť je arbitrárne definovaná ako molekulová hmotnosť nižšia ako 1 000 daltonov.

Číselná priemerná molekulová hmotnosť M_n a hmotnostná priemerná molekulová hmotnosť M_w sa stanovili pomocou týchto rovníc:

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

kde:

H_i = hladina signálu detektora od základnej čiary retenčného objemu V_i,

M_i = molekulová hmotnosť polymérovej frakcie pri retenčnom objeme V_i a n je počet dátových bodov

Šírka distribúcie molekulových hmotností, ktorá predstavuje mieru disperzity systému, je daná pomerom M_w/M_n.

▼B

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

GPC je relatívna metóda, a preto je potrebné uskutočniť kalibráciu. Bežne sa na tento účel používajú lineárne konštruované polystyrénové štandardy so známymi molekulovými hmotnosťami M_n a M_w a s úzkou oblasťou distribúcie. Kalibračnú krivku možno použiť na stanovenie molekulovej hmotnosti neznámej vzorky iba vtedy, ak sa pri separácii štandardov aj neznámej vzorky použijú úplne rovnaké podmienky.

Vzťahy stanovené medzi molekulovou hmotnosťou a elučným objemom sú platné iba pri špecifických podmienkach daného pokusu. Medzi tieto podmienky patrí predovšetkým teplota, typ rozpúšťadla (alebo zmesi rozpúšťadiel), chromatografické podmienky a rozdeľovacia kolóna alebo systém kolón.

Takto stanovené molekulové hmotnosti vzoriek predstavujú pomerné hodnoty a označujú sa ako „molekulové hmotnosti polystyrénového ekvivalentu“. Znamená to, že v závislosti od štruktúrálnych a chemických rozdielov medzi vzorkou a štandardmi sa môžu molekulové hmotnosti do väčšej alebo menšej miery od svojich absolútnych hodnôt odlišovať. Prípadné použitie iných štandardov, napríklad polyetylénglykolu, polyetylénoxidu, polymetylmetakrylátu alebo kyseliny polyakrylovej, je potrebné odôvodniť.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Distribúciu molekulových hmotností vzorky aj priemerné molekulové hmotnosti (M_n, M_w) možno stanoviť pomocou metódy GPC. Metóda GPC predstavuje osobitný typ kvapalinovej chromatografie, pri ktorej dochádza k rozdeleniu vzorky na základe hydrodynamických objemov jej jednotlivých zložiek (2).

K oddeľovaniu dochádza pri prechode vzorky cez kolónu, ktorá je naplnená poréznym materiálom, ktorým je zvyčajne organický gél. Malé molekuly cez póry prechádzajú, zatiaľ čo veľké molekuly sa z objemu gélu vylučujú. Dráha, ktorú prekonajú veľké molekuly, je preto kratšia a tieto sa vylučujú ako prvé. Molekuly strednej veľkosti do niektorých pórov vnikajú a vylučujú sa z kolóny neskôr. Najmenšie molekuly s hydrodynamickým priemerom menším, ako je veľkosť pórov gélu, môžu vnikať do všetkých z nich a vylučujú sa ako posledné.

V ideálnych podmienkach závisí oddeľovanie výlučne od veľkosti jednotlivých molekúl, no v praxi býva ťažké vyhnúť sa aspoň určitej interferencii absorpčných vplyvov. Situácia sa môže zhoršiť aj v dôsledku nerovnomerného naliatia kolóny a mŕtvych objemov (2).

Detekciu možno uskutočňovať napríklad pomocou merania indexu lomu alebo UV-absorpcie eluátov. Na základe takýchto údajov je možné zostrojiť jednoduchú distribučnú krivku. Molekulové hmotnosti možno bodom na distribučnej krivke prisúdiť iba po predchádzajúcom okalibrovaní kolóny. Robí sa to tak, že na kolónu sa nanesú polyméry so známou molekulovou hmotnosťou, v ideálnom prípade aj s približne podobnou štruktúrou, napríklad rozličné polystyrénové štandardy. Zvyčajne sa získava gaussovská krivka, ktorá býva niekedy na strane nízkych molekulových hmotností mierne pretiahnutá. Zvislá os udáva hmotnostné množstvo jednotlivých typov molekúl vyplavených z kolóny, vodorovná os je vyjadrená ako dekadický logaritmus molekulovej hmotnosti.

▼B

Obsah zložiek s nízkou molekulovou hmotnosťou sa odvádza z tejto krivky. Výpočet môže byť presný iba vtedy, ak zložky s nízkou molekulovou hmotnosťou ekvivalentne na hmotnostnom základe zodpovedajú polyméru ako celku.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Reprodukovateľnosť (relatívna štandardná odchýlka, RSD) elučného objemu by mala byť lepšia ako 0,3 %. Ak sa chromatogram vyhodnocuje nezávisle od času a ak nespĺňa vyššie uvedené kritérium, potom je potrebné zabezpečiť reprodukovateľnosť analýzy pomocou vnútorného štandardu (1). Polydisperzita závisí od molekulových hmotností štandardov. V prípade polystyrénových štandardov sú typické tieto hodnoty:

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

(M_p je molekulová hmotnosť štandardu v maxime píku)

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. **Príprava štandardných roztokov polystyrénu**

Polystyrénové štandardy sa rozpustia opatrným miešaním vo zvolenom elučnom činidle. Pri príprave roztokov sa treba riadiť odporúčaniami výrobcov.

Voľba koncentrácií štandardov závisí od rozličných faktorov, napríklad od nanášacieho objemu, viskozity roztoku a citlivosti analytického detektora. Maximálny nanášací objem sa musí prispôsobiť dĺžke kolóny, aby nedochádzalo k jej preťaženiu. Zvyčajné nanášacie objemy pri analytických separáciách pomocou GPC sa pri kolóne s rozmerom 30 cm × 7,8 mm pohybujú v rozmedzí 40 µl až 100 µl. Je možné použiť aj vyššie objemy, nemali by však presiahnuť 250 µl. Pred samotnou kalibráciou kolóny je potrebné určiť optimálny pomer medzi nanášacím objemom a koncentráciou nanášanej vzorky.

1.6.2. **Príprava roztoku vzorky**

V zásade rovnaké požiadavky sa vzťahujú aj na prípravu roztokov vzoriek. Vzorka sa opatrným potriasaním rozpustí vo vhodnom rozpúšťadle, napríklad v tetrahydrofuráne (THF). V žiadnom prípade ju nemožno rozpúšťať v ultrazvukovom kúpeli. V prípade potreby sa vzorka prečistí filtráciou cez membránový filter s veľkosťou pórov medzi 0,2 µm a 2 µm.

V záverečnej správe je potrebné zmieniť sa o prítomnosti nerozpustených tuhých častíc, ktoré môžu byť dôsledkom prítomnosti vysokých molekulových hmotností. Percentuálne zastúpenie hmotnosti rozpustených čiastočiek je potrebné určiť pomocou primeranej metódy. Roztoky sa musia použiť do 24 hodín.

▼B

1.6.3. **Korekcia na obsah nečistôt a prímesí**

Zvyčajne je potrebné vykonať korekciu na obsah molekúl s molekulovou hmotnosťou M < 1 000, ktorými prispievajú zložky nepolymérovej povahy (napríklad nečistoty, resp. prímesi). Korekciu netreba vykonať v prípade, ak je ich nameraný obsah nižší ako 1 %. Na tento účel možno analyzovať priamo roztok polyméru alebo GPC eluát.

V prípadoch, v ktorých je eluát po prechode cez kolónu na vykonanie ďalšej analýzy príliš zriedený, treba ho koncentrovať. Môže byť potrebné eluát odpariť dosucha a opätovne rozpustiť. Koncentrovanie eluátu treba vykonať za takých podmienok, ktoré zaručia, že v ňom neprebehnú žiadne zmeny. Spracovanie eluátu po GPC závisí od analytickej metódy, ktorá sa použije na kvantitatívne stanovenie.

1.6.4. **Prístrojové vybavenie**

Prístrojové vybavenie GPC zahŕňa tieto zložky:

— nádrž na rozpúšťadlo,

— zariadenie na odplyňovanie kvapalín (ak je potrebné),

— čerpadlo,

— tlmič pulzov kvapaliny (ak je potrebný),

— nanášací systém,

— chromatografické kolóny,

— detektor,

— prietokomer (ak je potrebný),

— zariadenie na zaznamenávanie a spracúvanie údajov,

— nádoba na odpad.

Treba zabezpečiť inertnosť systému GPC voči používaným rozpúšťadlám (napríklad použitím oceľových kapilár, ak je rozpúšťadlo THF).

1.6.5. **Nanášací systém a systém na privádzanie rozpúšťadla**

Buď pomocou automatického nanášacieho zariadenia, alebo ručne sa na kolónu nanesie v ostro vymedzenej zóne definované množstvo roztoku vzorky. Príliš rýchle vytiahnutie striekačky alebo stlačenie jej piestu pri ručnom nanášaní vzorky môže spôsobiť zmeny v pozorovanej distribúcii molekulových hmotností. Systém na privádzanie rozpúšťadla by nemal spôsobovať pulzové vlny, čo možno v ideálnom prípade zabezpečiť zaradením tlmiča pulzov. Rýchlosť prietoku sa pohybuje okolo hodnoty 1 ml/min.

1.6.6. **Kolóna**

V závislosti od vzorky možno polymér charakterizovať buď pomocou jedinej kolóny, alebo pomocou viacerých za sebou spojených kolón. Ako náplň kolóny je komerčne dostupných viacero poréznych materiálov s definovanými vlastnosťami (napríklad veľkosť pórov, limit vylučovania). Voľba separačného gélu a dĺžky kolóny závisí od vlastností vzorky (hydrodynamické objemy, distribúcia molekulových hmotností) aj od špecifických podmienok pri separácii, napríklad od typu rozpúšťadla, teploty a rýchlosti prietoku (1) (2) (3).

▼B

1.6.7. **Teoretické poschodia kolóny**

Kolóna alebo kombinácia viacerých kolón používaných pri separácii musí byť charakterizovaná počtom teoretických poschodí. V prípade THF ako rozpúšťadla sa to robí tak, že na kolónu so známou dĺžkou sa nanesie roztok etylbenzénu alebo iného vhodného nepolárneho rozpúšťadla. Počet teoretických poschodí udáva táto rovnica:

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

kde:

N = počet teoretických poschodí

V_e = elučný objem v maxime píku

W = šírka píku pri základnej čiare

$W_{1/2}$ = šírka píku v polovici jeho výšky

1.6.8. **Účinnosť separácie**

Okrem počtu teoretických poschodí, ktorý určuje šírku pásu, hrá pri separácii úlohu aj jej účinnosť, ktorá sa určuje na základe strmosti kalibračnej krivky. Účinnosť separácie kolóny možno získať z tohto vzťahu:

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

kde:

$V_{e,\ Mx}$ = elučný objem polystyrénu s molekulovou hmotnosťou M_x

$V_{e,(10.M_x)}$ = elučný objem polystyrénu s desaťnásobne väčšou molekulovou hmotnosťou

Rozlíšiteľnosť systému sa zvyčajne definuje takto:

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

kde:

V_{e1}, V_{e2} = elučné objemy dvoch polystyrénových štandardov v maxime píku

W_1, W_2 = šírky píkov pri základnej čiare

M_1, M_2 = molekulové hmotnosti v maxime píku (mali by sa líšiť o faktor 10).

R-hodnota kolóny musí byť vyššia ako 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Rozpúšťadlá**

Všetky rozpúšťadlá musia mať vysoký stupeň čistoty (pri THF je stupeň čistoty 99,5 %). Zásobník na rozpúšťadlo (v prípade potreby s atmosférou inertného plynu) musí byť dostatočne veľký na to, aby umožnil kalibráciu kolóny a analýzu niekoľkých vzoriek. Pred vháňaním do kolóny treba elučné činidlo zbaviť plynov pomocou čerpadla.

1.6.10. **Kontrola teploty**

Teplota kritických vnútorných zložiek systému (nanášacia slučka, detektor a hadičky) musí byť stála a musí zodpovedať zvolenému rozpúšťadlu.

1.6.11. **Detektor**

Účelom detektora je kvantitatívne zaznamenávanie koncentrácie vzorky eluovanej z kolóny. V záujme eliminácie zbytočného rozširovania píku by mala mať kyveta meracej komôrky detektora čo možno najmenší objem. S výnimkou detektorov založených na rozptyle svetla a viskozitných detektorov by nemal presahovať 10 µl. Ako detekčná metóda sa zvyčajne používa diferenciálna refraktometria. Možno použiť aj iné typy detektorov (napríklad UV/VIS, IR, viskozitný detektor atď.), ak si to vyžaduje osobitný charakter vzorky alebo elučného činidla.

2. **ÚDAJE A PRÍPRAVA TESTOVACEJ SPRÁVY**

2.1. ÚDAJE

Podrobné vyhodnocovacie kritériá a požiadavky vzťahujúce sa na zber a spracúvanie údajov sú uvedené v norme DIN (1).

Pri každej vzorke je potrebné uskutočniť dva nezávislé pokusy. Každý z nich treba analyzovať osobitne.

Pri každom meraní treba udať M_n, M_w, M_w/M_n a M_p. Treba výslovne uviesť, že namerané hodnoty sú pomerné hodnoty, ekvivalentné použitým štandardom.

Po stanovení retenčných objemov alebo retenčných časov (podľa možnosti korigovaných použitím vnútorného štandardu) sa voči jednej z týchto hodnôt nanášajú do grafu hodnoty log M_p (M_p je maximum píku kalibračného štandardu). Na každú dekádu molekulových hmotností treba použiť aspoň dva kalibračné body, na zostrojenie celej kalibračnej krivky, ktorá by mala pokrývať odhadnutú molekulovú hmotnosť vzorky, je potrebných aspoň päť bodov. Koncový bod kalibračnej krivky v oblasti nízkych molekulových hmotností sa definuje pomocou n-hexylbenzénu alebo iného vhodného nepolárneho rozpúšťadla. Pri stanovení sa časť krivky zodpovedajúcej molekulovým hmotnostiam nižším ako 1 000 podľa potreby koriguje na nečistoty a prísady. Nanášacie krivky sa zvyčajne hodnotia pomocou elektronického spracovania údajov. V prípade manuálnej digitalizácie sa možno riadiť dokumentom ASTM D 3536-91 (3).

▼B

V prípade zadržania každého nerozpustného polyméru v kolóne je vysoko pravdepodobné, že jeho molekulová hmotnosť je vyššia ako molekulová hmotnosť rozpustnej frakcie. Výsledkom nevzatia tejto skutočnosti do úvahy môže byť nadhodnotenie zastúpenia zložiek s nízkou molekulovou hmotnosťou. Návod na uskutočnenie korekcie obsahu zložiek s nízkou molekulovou hmotnosťou na nerozpustný polymér je uvedený v dodatku.

Distribučná krivka sa musí znázorniť vo forme tabuľky alebo graficky (diferenciálna frekvencia alebo kumulatívna frekvencia v percentách proti log M). V grafickom znázornení by mal mať jeden poriadok molekulovej hmotnosti dĺžku 4 cm a výška maxima píku by mala byť asi 8 cm. Pri integrálnych distribučných krivkách by mala byť vzdialenosť medzi 0 % a 100 % na osi y približne 10 cm.

2.2. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať tieto informácie:

2.2.1. **Testovaná látka:**

— dostupné informácie o testovanej látke (totožnosť, prísady, nečistoty/prímesi),

— opis spracovania vzorky, zistené skutočnosti, problémy.

2.2.2. **Prístroje a zariadenia:**

— zásobník na elučné činidlo, inertný plyn, odplynenie elučného činidla, zloženie elučného činidla, nečistoty/prímesi,

— čerpadlo, tlmič pulzov kvapaliny, nanášací systém,

— rozdeľovacie kolóny (výrobca, všetky informácie o charakteristikách kolón, ako napríklad veľkosť pórov, druh separačného materiálu atď., počet, dĺžka a usporiadanie použitých kolón),

— počet teoretických poschodí kolóny (alebo kombinácie kolón), účinnosť rozdeľovania (rozlišovacia schopnosť systému),

— informácie o symetrii píkov,

— teplota kolóny, spôsob kontroly teploty,

— detektor (princíp merania, typ, objem kyvety),

— prietokomer, ak sa používa (výrobca, princíp merania),

— systém na zaznamenávanie a spracúvanie údajov (hardvér a softvér).

2.2.3. **Kalibrácia systému:**

— podrobný opis metódy použitej na zostrojenie kalibračnej krivky,

▼B

— informácie o kritériách kvality tejto metódy (napríklad korelačný koeficient, odchýlka súčtu štvorcov atď.),

— informácie o všetkých extrapoláciách, predpokladoch a aproximáciách, ktoré sa uskutočnili počas priebehu pokusu a o vyhodnocovaní a spracúvaní údajov,

— všetky merania, ktoré boli použité na zostrojenie kalibračnej krivky, musia byť

  — zdokumentované v tabuľke, ktorá obsahuje tieto informácie pre každý bod merania:

  — názov vzorky,

  — výrobcu vzorky, charakteristické hodnoty štandardov, t. j. M_p, M_n, M_w a M_w/M_n, tak ako ich uvádza výrobca alebo ako boli odvodené z následných meraní, ako aj podrobnosti o metóde stanovenia,

  — nanášací objem a koncentráciu nanesenej vzorky,

  — hodnotu M_p, ktorá bola použitá na kalibráciu,

  — elučný objem alebo opravený retenčný čas nameraný pri maxime píku,

  — M_p vypočítanú v maxime píku,

  — percentuálnu odchýlku vypočítanej hodnoty M_p od kalibračnej krivky.

2.2.4. **Informácie o obsahu polyméru s nízkou molekulovou hmotnosťou:**

— opis metódy, ktorá sa použila na vykonanie analýzy, a spôsobu vykonania pokusu,

— informácie o percentuálnom obsahu molekúl s nízkou molekulovou hmotnosťou (w/w) vzhľadom na celkové množstvo vzorky,

— informácie o percentuálnom obsahu (w/w) nečistôt, prísad a iných molekúl nepolymérovej povahy vzhľadom na celkové množstvo vzorky.

2.2.5. **Vyhodnotenie:**

— vyhodnotenie na základe času: metódy použité na zabezpečenie požadovanej reprodukovateľnosti (korekčná metóda, vnútorné štandardy atď.),

— informácia o tom, či bolo vyhodnotenie vykonané na základe elučného objemu alebo retenčného času,

— informácie o limitoch vyhodnocovania, ak nebola vykonaná úplná analýza píku,

— opis vyrovnávacej/prekladacej metódy, ak sa použila,

— príprava a predbežné spracovanie vzorky,

— prítomnosť nerozpustených čiastočiek, ak boli pozorované,

▼B

— objem (μl) a koncentrácia (mg/ml) nanesenej vzorky,

— opísanie vplyvov, ktoré mohli spôsobiť odchýlku od ideálneho GPC profilu,

— podrobné opísanie modifikácií uskutočnených v testovacej metóde,

— podrobnosti o rozsahu chýb merania,

— všetky iné informácie a pozorované skutočnosti, ktoré by mohli byť významné z hľadiska interpretácie výsledkov.

3. **ODKAZY**

(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

Dodatok

Návod na uskutočnenie korekcie obsahu zložiek s nízkou molekulovou hmotnosťou na nerozpustný polymér

Prítomnosť nerozpustného polyméru vo vzorke spôsobuje úbytok hmotnosti počas analýzy GPC. Nerozpustný polymér sa nevratne zachytáva v kolóne alebo na filtri, zatiaľ čo rozpustná časť vzorky prechádza cez kolónu. Ak je možné určiť alebo merať prírastok indexu lomu (dn/dc) polyméru, potom je možné určiť aj veľkosť straty hmotnosti vzorky v kolóne. V takomto prípade sa uskutočňuje korekcia pomocou externej kalibrácie, pri ktorej sa na kalibrovanie odpovede refraktometra používajú štandardné materiály so známou koncentráciou a známym pomerom dn/dc. V príklade, ktorý je uvedený v ďalšom texte, sa ako štandard použil poly(metyl)metakrylát (pMMA).

Pri externej kalibrácii pre analýzu akrylových polymérov sa ako štandard používa roztok pMMA so známou koncentráciou v tetrahydrofuráne, ktorý sa podrobuje analýze pomocou GPC. Zo získaných údajov sa pomocou tohto vzťahu zistí konštanta refraktometra:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

kde:

K = konštanta refraktometra (v mikrovoltsekundách/ml),

R = nameraná hodnota pre pMMA (v mikrovoltsekundách),

C = koncentrácia štandardu pMMA (mg/ml),

V = objem vzorky nanesenej do refraktometra (ml) a

dn/dc = prírastok indexu lomu pre roztok pMMA v tetrahydrofuráne (v ml/mg).

Pri štandardoch pMMA sa zvyčajne získavajú tieto údaje:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg

Výsledná hodnota $K = 3{,}05 \times 10^{11}$ sa potom použije na vypočítanie teoretickej odpovede detektora, ak ním prejde 100 % naneseného polyméru.

▼B

A.20. **ROZPÚŠŤACIE/EXTRAKTÍVNE VLASTNOSTI POLYMÉROV VO VODE**

1. **METÓDA**

Metóda je prevzatá z revidovanej verzie OECD TG 120 (1997). Ďalšie technické informácie sa nachádzajú v odkaze (1).

1.1. ÚVOD

Skôr ako sa pri určitých polyméroch, napríklad emulzných, bude dať použiť metóda, ktorá je opísaná v ďalšom texte, môže byť potrebné vykonať prípravné postupy. Metódu nemožno použiť pri kvapalných polyméroch a pri polyméroch, ktoré pri pokusných podmienkach reagujú s vodou.

V prípadoch, v ktorých nie je metóda praktická alebo uskutočniteľná, možno extrakčné vlastnosti polymérov stanovovať inými metódami, ktoré je potrebné podrobne opísať a ich použitie odôvodniť.

1.2. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Extraktívne vlastnosti polymérov vo vodnom prostredí sa stanovujú pomocou bankovej metódy (pozri A.6 Rozpustnosť vo vode, Banková metóda) s modifikáciami, ktoré sú opísané v ďalšom texte.

1.4. KVALITATÍVNE KRITÉRIÁ

Žiadne.

1.5. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.5.1. **Vybavenie**

Pre metódu je potrebné toto vybavenie:

— drviace zariadenie, napríklad drvič, na získanie čiastočiek so známou veľkosťou,

— trepacie zariadenie s možnosťou kontrolovania teploty,

— systém membránových filtrov,

— primerané analytické zariadenie,

— štandardizované sitá.

1.5.2. **Príprava vzorky**

Reprezentatívna vzorka sa najprv rozdrví a pomocou primeraných sít upraví tak, aby sa získali čiastočky s veľkosťou medzi 0,125 mm a 0,25 mm. Počas drvenia môže byť v záujme zachovania stability vzorky potrebné zabezpečiť chladenie. Materiály gumovitej konzistencie možno drviť pri teplote kvapalného dusíka (1).

Ak dosiahnutie uvedeného rozmeru čiastočiek nie je možné, potom je potrebné pokúsiť sa o dosiahnutie ich najmenšieho možného rozmeru a výsledok treba zaznamenať. V testovacom protokole je potrebné uviesť spôsob uskladnenia vzorky pred vykonaním testu.

▼B

1.5.3. **Postup**

Do každej z troch nádob so sklenou zátkou sa naváži 10 g testovanej látky a pridá sa k nim 1 000 ml vody. Ak spracúvanie 10 g testovanej látky nie je z praktického hľadiska možné, potom treba použiť jej najvyššie možné množstvo blízke tejto hodnote a objem vody mu treba príslušným spôsobom prispôsobiť.

Potom sa nádoby tesne uzavrú a nechajú sa premiešavať pri teplote 20 °C. Treba pri tom použiť trepacie alebo miešacie zariadenie pracujúce pri stálej teplote. Po 24 hodinách sa obsah každej nádoby scentrifuguje alebo prefiltruje a pomocou vhodnej analytickej metódy sa v čírej vodnej fáze stanoví koncentrácia polyméru. Ak pre vodnú fázu neexistujú vhodné analytické metódy, potom možno celkovú rozpustnosť/extraktivitu stanoviť na základe suchej hmotnosti zvyšku na filtri alebo suchej hmotnosti scentrifugovanej usadeniny.

Zvyčajne býva potrebné uskutočniť kvantitatívne rozlíšenie medzi nečistotami a prímesami na jednej strane a medzi polymérnymi zložkami s nízkou molekulovou hmotnosťou na druhej strane. V prípade gravimetrických stanovení je tiež dôležité vykonať slepé meranie bez testovacej látky, aby sa vzali do úvahy prímesi/nečistoty, ktoré sa do pokusu zanášajú počas jeho postupu.

Rozpúšťacie/extraktívne správanie polymérov vo vode pri 37 °C pH 2 a pH 9 možno stanoviť rovnakým spôsobom ako pri vykonávaní pokusu pri 20 °C. Požadované hodnoty pH možno dosiahnuť pridaním buď vhodných tlmivých roztokov, alebo vhodných kyselín, alebo zásad, ako sú kyselina chlorovodíková, kyselina octová, hydroxid sodný alebo draselný analytickej čistoty, alebo NH_3.

V závislosti od použitej analytickej metódy treba uskutočniť jeden alebo dva testy. Ak sú na priame analyzovanie obsahu polymérovej zložky vodnej fázy k dispozícii dostatočne špecifické metódy, potom by mal postačovať jediný z horeuvedených testov. Ak však takéto metódy k dispozícii nie sú a stanovenie rozpúšťacích/extraktívnych vlastností polyméru je obmedzené na nepriamu analýzu pomocou stanovenia iba celkového množstva organicky viazaného uhlíka (TOC) vo vodnom extrakte, potom je potrebné uskutočniť prídavný test. Takýto prídavný test je potrebné vykonať v triplikátoch s použitím desaťnásobne menšieho množstva polyméru a rovnakého množstva vody ako pri prvom teste.

1.5.4. **Analýza**

1.5.4.1. *Testy vykonávané s jedným množstvom vzorky*

Môžu existovať metódy na priamu analýzu polymerických zložiek vodnej fázy. Možno uvažovať taktiež o nepriamej analýze rozpustených/extrahovaných zložiek, pri ktorej sa stanovuje celkové množstvo rozpustných čiastočiek, ktoré sa upravuje na obsah zložiek nepolymérovej povahy.

Analýzu celkového obsahu polymérových látok vo vodne fáze možno uskutočniť:

buď pomocou dostatočne citlivej metódy, napríklad:

— pomocou stanovenia TOC, pri ktorom sa vzorka najprv rozloží kyselinou persírovou alebo kyselinou dvojchrómovu za vzniku CO_2, po čom nasleduje stanovenie pomocou IR alebo chemickej analýzy,

▼B

— pomocou atómovej absorpčnej spektrometrie (AAS) alebo na ekvivalentnej metóde založenej na emisii induktívne naviazanej plazmy (Inductively Coupled Plasma, ICP) pri polyméroch s obsahom kremíka alebo kovov,

— pomocou UV absorpcie alebo spektrofluorometrie pri arylových polyméroch,

— LC-MS pri nízkomolekulárnych vzorkách,

alebo pomocou vákuového odparenia vodného extraktu dosucha a následnou spektroskopickou (IR, UV atď.) alebo AAS/ICP analýzou zvyšku.

Ak analýza vodnej fázy ako takej nie je z praktického hľadiska uskutočniteľná, potom treba podrobiť vodný extrakt extrakcii organickým rozpúšťadlom nemiešateľným s vodou, čo môže byť napríklad chlórovaný uhľovodík. Rozpúšťadlo sa potom nechá odpariť a zvyšok sa analyzuje na obsah daného polyméru vyššie uvedeným spôsobom. Všetky zložky takéhoto zvyšku, ktoré sa vyhodnotia ako nečistoty alebo prímesi, je potrebné od výsledku odrátať, aby sa stanovil stupeň rozpustnosti/extrakcie iba samotného polyméru.

Ak je množstvo takýchto materiálov vo vzorke relatívne veľké, potom môže byť potrebné podrobiť zvyšok napríklad analýze pomocou HPLC alebo GC. Umožní to odlíšiť nečistoty od prítomných monomérov alebo ich derivátov, čím sa umožní stanovenie ich skutočného obsahu.

V niektorých prípadoch môže postačovať jednoduché odparenie organického rozpúšťadla dosucha a odváženie zvyšku.

1.5.4.2. *Testy vykonávané s dvoma množstvami vzorky*

Všetky vodné extrakty sa analyzujú na prítomnosť TOC.

Nerozpustená/neextrahovaná časť vzorky sa podrobí gravimetrickému stanoveniu. Ak zostanú po centrifugácii alebo filtrácii obsahu každej banky prichytené na stenách nádoby zvyšky polyméru, potom treba nádobu oplachovať filtrátom dovtedy, kým sa na jej stenách nebude nachádzať žiaden viditeľný zvyšok. Filtrát sa potom podrobí opätovnej centrifugácii alebo filtrácii. Zvyšky, ktoré zostanú na filtri alebo v centrifugačnej kyvete, sa nechajú vysušiť pri 40 ^{o}C a odváži sa. V sušení sa pokračuje až po dosiahnutie konštantnej hmotnosti.

2. **ÚDAJE**

2.1. TESTY VYKONÁVANÉ S JEDNÝM MNOŽSTVOM VZORKY

Je potrebné uviesť jednotlivé výsledky získané pri každej z troch baniek a priemerné hodnoty vyjadrené v jednotkách hmotnosti na objem roztoku (zvyčajne mg/l) alebo v jednotkách hmotnosti na hmotnosť vzorky polyméru (zvyčajne mg/g). Treba uviesť i straty hmotnosti vzorky (vypočítané ako hmotnosť rozpustenej látky vydelená hmotnosťou pôvodnej vzorky). Treba vypočítať relatívne štandardné odchýlky (RSD). Údaje pre celkové množstvo látky (polymér + hlavné prímesi atď.) a iba pre samotný polymér (t. j. po odčítaní príspevku vyššie uvedených prímesí) treba uviesť osobitne.

▼B

2.2. TESTY VYKONÁVANÉ S DVOMA MNOŽSTVAMI VZORKY

Treba uviesť jednotlivé hodnoty TOC vodných extraktov oboch pokusov vykonaných v triplikátoch, vyjadrené v jednotkách hmotnosti na objem rozpúšťadla (zvyčajne mgC/l), ako aj v jednotkách hmotnosti na hmotnosť pôvodnej vzorky (zvyčajne mgC/g).

Z neexistencie rozdielu medzi výsledkami získanými pri vysokom a nízkom pomere vzorka/voda môže vyplývať, že všetky extrahovateľné látky boli skutočne aj extrahované. V takomto prípade nebude priama analýzy zvyčajne potrebná.

Treba uviesť jednotlivé hmotnosti zvyškov vyjadrené ako percentuálny podiel z pôvodnej hmotnosti vzorky. Pri každom z pokusov treba vypočítať priemerné hodnoty. Rozdiely medzi hodnotou 100 a zisteným percentuálnym zastúpením predstavujú percentuálne zastúpenie rozpustenej a extrahovateľnej hmoty v pôvodnej vzorke.

3. **PRÍPRAVA TESTOVACEJ SPRÁVY**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať tieto informácie:

3.1.1. **Testovaná látka:**

— dostupné informácie o testovanej látke (totožnosť, prímesy, nečistoty, obsah nízkomolekulárnych zložiek).

3.1.2. **Pokusné podmienky:**

— opis použitých postupov a pokusných podmienok,

— opis analytických a detekčných metód.

3.1.3. **Výsledky:**

— výsledky týkajúce sa rozpustnosti/extrahovateľnosti v mg/l; jednotlivé a priemerné hodnoty extrakčných testov pri jednotlivých roztokoch, rozdelené podľa obsahu polyméru a nečistôt, prímesí atď.,

— výsledky týkajúce sa rozpustnosti/extrahovateľnosti v mg/g polyméru,

— TOC hodnoty vodných extraktov, hmotnosť rozpusteného podielu a vypočítané percento, ak bolo stanovené,

— pH každej vzorky,

— informácie o hodnotách získaných pri slepých vzorkách,

— ak je potrebné, aj informácie o chemickej nestálosti testovanej látky počas samotného testovania aj analytických postupov,

— všetky informácie, ktoré môžu mať význam pre interpretovanie výsledkov.

4. **ODKAZY**

(1) DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B

A.21. **OXIDAČNÉ VLASTNOSTI (KVAPALINY)**

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Táto metóda je určená na meranie potenciálu kvapalnej látky zvýšiť rýchlosť alebo intenzitu horenia horľavej látky alebo tvoriť s horľavou látkou zmes, ktorá sa samovoľne vznieti, keď sa obe látky dôkladne zmiešajú. Zakladá sa na teste OSN pre oxidujúce kvapaliny (1) a je s ním rovnocenná. Metóda A.21 je určená predovšetkým na splnenie požiadaviek nariadenia (ES) č. 1907/2006, vyžaduje sa však porovnanie iba s jednou referenčnou látkou. Ak sa očakáva, že výsledky testu sa použijú na iné účely, môže byť potrebné testovanie a porovnanie s ďalšími referenčnými látkami ([1]).

Tento test nie je potrebné vykonať, ak sa na základe posúdenia štruktúrneho vzorca nepochybne potvrdí, že látka nie je schopná s horľavým materiálom exotermicky reagovať.

Pred uskutočnením testu je užitočné mať predbežné informácie o akýchkoľvek potenciálnych výbušných vlastnostiach látky.

Tento test nie je vhodný pre tuhé látky, plyny, výbušné alebo veľmi horľavé látky, alebo organické peroxidy.

Ak sú pre testovanú látku už dostupné výsledky testu OSN pre oxidujúce kvapaliny, tento test sa nemusí vykonať (1).

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Priemerný čas zvýšenia tlaku je priemerná hodnota nameraných časov, počas ktorých testovaná zmes spôsobí zvýšenie tlaku od 690 kPa do 2 070 kPa nad atmosférický tlak.

1.3. REFERENČNÁ LÁTKA

Ako referenčná látka sa používa vodný roztok kyseliny dusičnej (65 hmotnostných %, čistota p. a. – analyticky čistý) ([2]).

([1]) Napríklad v rámci transportných predpisov OSN.
([2]) Kyselina sa musí titrovať pred testovaním, aby sa potvrdila jej koncentrácia.

▼B

Nepovinne, ak experimentátor predpokladá, že výsledky tejto skúšky sa môžu prípadne použiť na iné účely ([1]), môže sa tiež vykonať skúška ďalších referenčných látok ([2]).

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Kvapalina, ktorá sa má testovať, sa zmieša s vláknitou celulózou v hmotnostnom pomere 1:1 a zmes sa nadávkuje do tlakovej nádoby. Ak počas zmiešavania alebo dávkovania nastane samovoľné vznietenie, ďalšie testovanie nie je potrebné.

Ak samovznietenie nenastane, vykoná sa celý test. Zmes sa v tlakovej nádobe zahrieva a stanoví sa priemerný čas zvýšenia tlaku od 690 kPa do 2 070 kPa nad atmosférický tlak. Tento čas sa porovná s priemerným časom zvýšenia tlaku pre zmes referenčnej látky (referenčných látok) a celulózy (1:1).

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

V sérii piatich pokusov na jedenej látke by sa ani jeden výsledok nemal odlišovať od aritmetického priemeru o viac ako 30 %. Výsledky, ktoré sa odlišujú od priemeru o viac ako 30 %, sa vylúčia, zdokonalí sa postup zmiešavania a dávkovania a testovanie sa zopakuje.

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Príprava**

1.6.1.1. *Horľavá látka*

Ako horľavý materiál sa používa vysušená, vláknitá celulóza s dĺžkou vlákien medzi 50 μm a 250 μm a priemernou hodnotou priemeru 25 μm ([3]). Celulóza sa suší pri 105 °C počas 4 hodín do konštantnej hmotnosti vo vrstve s hrúbkou najviac 25 mm a počas chladnutia a pred použitím sa uchováva v exsikátore so sušidlom. Obsah vody vo vysušenej celulóze by mal byť nižší ako 0,5 % suchej hmotnosti ([4]). Na to, aby sa dosiahla takáto hodnota, sa v prípade potreby čas sušenia predĺži ([5]). Počas skúšky je potrebné používať rovnakú šaržu celulózy.

([1]) Napríklad v rámci transportných predpisov OSN.
([2]) Napr.: 50 hmotnostných % (w/w) perchlórovej kyseliny a 40 hmotnostných % chlorečnanu sodného sa používa v odkaze (1).
([3]) t. j. celulózový prášok z Whatmanovej stĺpcovej chromatografie CF 11, katalógové č. 4021 050.
([4]) Potvrdené (napr.) Karl-Fisherovou titráciou.
([5]) Alternatívne sa môže tento obsah vody tiež dosiahnuť (napr.) zahriatím na 105 °C vo vákuu na 24 h.

▼B

1.6.1.2. *Aparatúra*

1.6.1.2.1. T l a k o v á n á d o b a

Používa sa tlaková nádoba. Nádoba pozostáva z oceľovej tlakovej nádoby valcovitého tvaru s dĺžkou 89 mm a vonkajším priemerom 60 mm (pozri obrázok 1). Dve plochy na protiľahlých stranách sú opracované (zmenšujúc prierez nádoby na 50 mm), aby bolo možné namontovanie zážihového a odvzdušňovacieho nástavca. Nádoba má vnútorný priemer 20 mm a na oboch koncoch je zoslabená do hĺbky 19 mm a opatrená závitom 1" (1 palec) podľa BSP (British Standard Pipe) alebo jeho metrickým ekvivalentom. Snímač tlaku v tvare bočného ramena je priskrutkovaný k zaoblenému povrchu tlakovej nádoby vo vzdialenosti 35 mm od jedného konca a v 90° uhle k opracovaným stranám. Príslušný otvor je vyvŕtaný do hĺbky 12 mm a na konci bočného ramena vybavený závitom na 1/2 podľa BSP (alebo jeho metrickým ekvivalentom). V prípade potreby sa na zabezpečenie plynotesného utesnenia upevní inertné tesnenie. Bočné rameno vyčnieva 55 mm z tlakovej nádoby a má 6 mm vývrt. Koniec bočného ramena je zoslabený a opatrený závitom na pripojenie membránového snímača tlaku. Môže sa použiť akékoľvek zariadenie na meranie tlaku, ktoré je odolné voči pôsobeniu horúcich plynov alebo produktov rozkladu a na rýchlosť zvýšenia tlaku v rozsahu 690 – 2 070 kPa dokáže reagovať za najviac 5 ms.

Koniec tlakovej nádoby, ktorý je ďalej od bočného ramena, je uzatvorený zážihovým nástavcom, ktorý je vybavený dvoma elektródami, jednou izolovanou od telesa nástavca a druhou uzemnenou k nástavcu. Druhý koniec tlakovej nádoby je uzatvorený poistným diskom (kritický tlak približne 2 200 kPa), upevneným v uzatváracom nástavci s 20 mm vývrtom. V prípade potreby sa na zabezpečenie plynotesného utesnenia zážihového nástavca použije inertné tesnenie. Počas používania je zariadenie udržiavané v správnej polohe stojanom (obrázok 2). Zvyčajne sa skladá z podložky z mäkkej ocele s rozmermi 235 mm × 184 mm × 6 mm a zo 185 mm dlhého štvorcového dutého profilu (ďalej len „Š.D.P.“) s rozmermi 70 mm × 70 mm × 4 mm.

Profil je na protiľahlých stranách jedného konca Š.D.P. zrezaný tak, že vznikne konštrukcia s dvoma plochými ramenami, ktoré prečnievajú o 86 mm nad celým rámom profilu. Konce plochých ramien sú zrezané pod uhlom 60° k horizontálnej rovine a privarené k podložke. Na jednej strane vrchného konca základne profilu je vyrezaný 22 mm široký a 46 mm hlboký otvor tak, aby sa pri vložení tlakovej nádoby do rámu profilu stojana dostal prvý zážihový nástavec a aby bočné rameno zapadlo do otvoru. Kus ocele, široký 30 mm a hrubý 6 mm, ktorý má funkciu rozpery, je privarený k dolnej časti vnútornej plochy rámu profilu. Na upevnenie tlakovej nádoby slúžia dve 7 mm prítlačné skrutky, ktoré sú priskrutkované do protiľahlej strany. Zospodu podopierajú tlakovú nádobu dva 12 mm široké pásy 6 mm hrubej ocele, privarené k bočným stranám dosadajúcim na rám profilu.

▼B

1.6.1.2.2. Systém zážihu

Systém zážihu pozostáva z 25 cm dlhého Ni/Cr drôtu, ktorý má priemer 0,6 mm a odpor 3,85 ohm/m. Drôt má špirálovitý tvar s vnútorným priemerom 5 mm a je pripojený k elektródam zážihového nástavca. Špirála musí byť usporiadaná jedným zo spôsobov zobrazených na obrázku 3. Vzdialenosť medzi dnom nádoby a spodnou časťou zážihovej špirály je 20 mm. Ak nie sú elektródy nastaviteľné, konce zážihového drôtu medzi špirálou a dnom nádoby musia byť izolované keramickým obalom. Drôt sa rozžeravuje konštantným prúdom najmenej 10 A.

1.6.2. **Vykonanie testu** ([1])

Kompletne zmontovaná aparatúra so snímačom tlaku a zážihovým systémom, ale bez vloženého poistného disku, sa pripevní na stojan tak, že zážihový nástavec bude v dolnej časti. V sklenenej kadičke sa sklenenou tyčinkou premieša 2,5 g testovanej kvapaliny s 2,5 g sušenej celulózy ([2]). Z bezpečnostných dôvodov sa miešanie vykonáva s ochranným štítom, ktorý je medzi experimentátorom a zmesou. Ak sa počas miešania alebo plnenia zmes vznieti, ďalšie testovanie nie je potrebné. Zmes sa pridáva do tlakovej nádoby v malých dávkach poklepávaním do tlakovej nádoby, pričom sa musí dávať pozor na to, aby zmes dostatočne pokryla zážihovú špirálu a bola s ňou v dobrom kontakte. Je dôležité, aby sa špirála počas dávkovania nezdeformovala, pretože by to mohlo viesť k chybným výsledkom ([3]). Do uzatváracieho nástavca sa vloží poistný disk a nástavec sa pevne zaskrutkuje. Naplnená nádoba sa presunie do stojanu tak, aby bol poistný disk v hornej polohe, umiestni sa vo vhodnom vystuženom digestore alebo v spaľovacej komore. Do zážihového nástavca sa pripojením na externú zásuvku pustí prúd 10 A. Čas medzi začiatkom miešania a zapnutím prúdu by nemal presiahnuť 10 minút.

Signál z tlakového snímača sa zaznamenáva na vhodný systém, ktorý umožňuje meranie a vytváranie permanentného záznamu získaného časového profilu zmeny tlaku (napr. záznamník spojený so zapisovačom). Zmes sa zahrieva dovtedy, kým nepraskne poistný disk alebo neuplynie aspoň 60 s. Ak poistný disk nepraskne, zmes sa pred opatrným rozobratím aparatúry nechá vychladnúť, pričom je potrebné dodržiavať bezpečnostné opatrenia pre prípad možného výskytu zvýšeného tlaku. Vykonáva sa päť pokusov s testovanou látkou a referenčnou látkou (referenčnými látkami). Zaznamenáva sa čas potrebný na zvýšenie tlaku zo 690 kPa na 2 070 kPa nad atmosférický tlak. Vypočíta sa priemerný čas zvýšenia tlaku.

V niektorých prípadoch môžu chemické reakcie látok, ktoré nesúvisia s ich oxidačnými vlastnosťami, spôsobiť (príliš vysoké alebo príliš nízke) zvýšenie tlaku. V takýchto prípadoch môže byť potrebné kvôli objasneniu povahy reakcie zopakovať test s inertnou látkou namiesto celulózy, napr. diatomit (kremelina).

([1]) So zmesami oxidačných činidiel s celulózou sa musí zaobchádzať ako s potenciálne explozívnymi a treba s nimi manipulovať s náležitou pozornosťou.

([2]) V praxi sa to dá dosiahnuť prípravou zmesi testovanej kvapaliny s celulózou v pomere 1:1 vo väčšom množstve, ako je potrebné pre test, a do tlakovej nádoby sa nadávkuje 5 g ± 0,1 g. Pre každý test osobitne sa pripraví čerstvá zmes.

([3]) Je potrebné zabrániť najmä kontaktu medzi susednými závitmi špirály.

▼B

2. **ÚDAJE**

Čas zvýšenia tlaku pre testovanú látku a referenčnú látku (referenčné látky). Čas zvýšenia tlaku pri testoch s inertnou látkou, ak sa realizovali.

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Vypočíta sa priemerný čas zvýšenia tlaku pre testovanú látku a referenčnú látku (referenčné látky).

Vypočíta sa priemerný čas zvýšenia tlaku pri testoch s inertnou látkou, ak sa realizovali.

Niektoré príklady výsledkov sú uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Príklady výsledkov ([a])

Látka ([b])	Priemerný čas zvýšenia tlaku pre zmes s celulózou v pomere 1:1 (ms)
Dichróman amónny, nasýtený vodný roztok	20 800
Dusičnan vápenatý, nasýtený vodný roztok	6 700
Dusičnan železitý, nasýtený vodný roztok	4 133
Chloristan lítny, nasýtený vodný roztok	1 686
Chloristan horečnatý, nasýtený vodný roztok	777
Dusičnan nikelnatý, nasýtený vodný roztok	6 250
Kyselina dusičná, 65 %	4 767 ([c])
Kyselina chloristá, 50 %	121 ([c])
Kyselina chloristá, 55 %	59
Dusičnan draselný, 30 % vodný roztok	26 690
Dusičnan strieborný, nasýtený vodný roztok	([d])
Chlorečnan sodný, 40 % vodný roztok	2 555 ([c])
Dusičnan sodný, 45 % vodný roztok	4 133
Inertná látka	
Voda: celulóza	([d])

([a]) Priemerná hodnote z medizilaboratórnych porovnácacích skúšok.
([b]) Maximálny tlak 2 070 kPa nedosiahnutý.
([c]) Nasýtené roztoky sa pripravujú pri teplote 20 °C.
([d]) Pozri odkaz (1) na interpretáciu výsledkov podľa transportných predpisov OSN pri použití rôznych referenčných látok.

▼B

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste obsahuje tieto informácie:

— identifikáciu, zloženie, čistotu atď. testovanej látky,

— koncentráciu testovanej látky,

— postup sušenia použitej celulózy,

— obsah vody v použitej celulóze,

— výsledky meraní,

— výsledky testov s inertnou látkou, ak existujú,

— vypočítané priemerné časy zvýšenia tlaku,

— všetky odchýlky od tejto metódy a ich dôvody,

— všetky doplňujúce poznámky a poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV ([1])

Výsledky testov sa vyhodnotia na základe:

a) toho, či sa zmes testovanej látky a celulózy samovoľne vznieti, a

b) porovnania priemerného času potrebného na zvýšenie tlaku od 690 kPa do 2 070 kPa s časom potrebným na zvýšenie tlaku v prípade referenčnej látky (referenčných látok).

Kvapalná látka sa pokladá za oxidačné činidlo, keď:

a) sa zmes látky a celulózy v hmotnostnom pomere 1:1 samovoľne vznieti alebo

b) zmes látky a celulózy v hmotnostnom pomere 1:1 má priemerný čas zvýšenia tlaku menší alebo rovnaký ako priemerný čas zvýšenia tlaku zmesi vodného roztoku kyseliny dusičnej a celulózy (65 hmotnostných %).

Na to, aby bol vylúčený falošný pozitívny výsledok, sa v prípade potreby pri interpretácii výsledkov zoberú do úvahy aj výsledky získané pri testovaní látky s inertným materiálom.

([1]) Pozri odkaz (1) na interpretáciu výsledkov podľa transportných predpisov OSN pri použití rôznych referenčných látok.

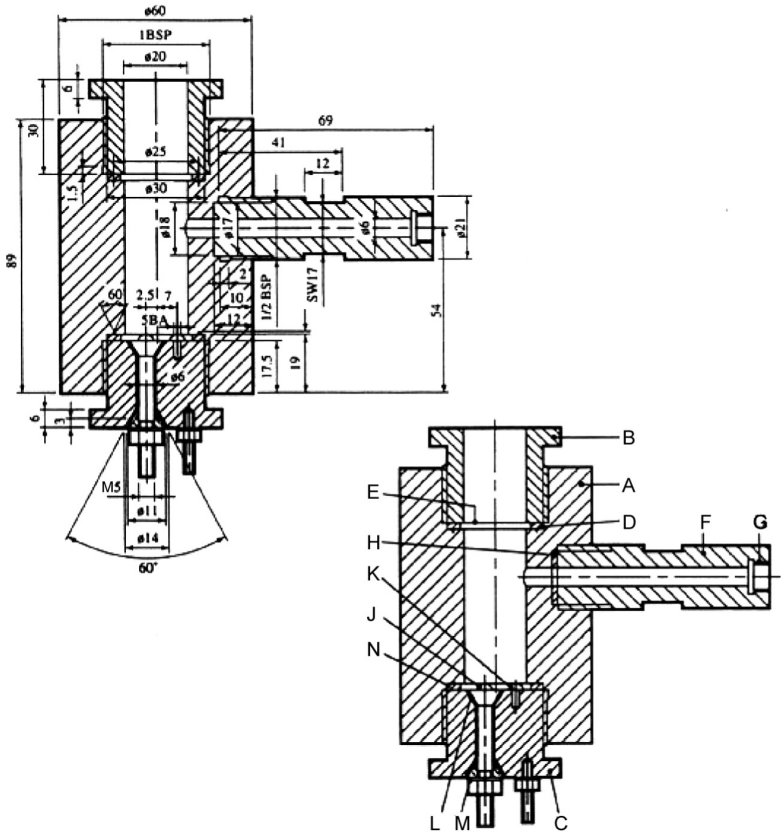
▼B

4. **ODKAZY**

(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, 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

Obrázok 1

Tlaková nádoba

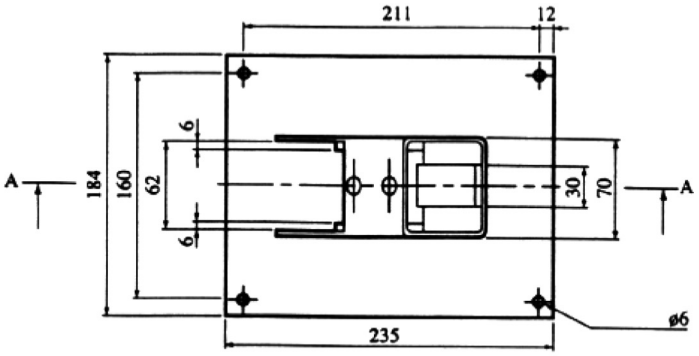


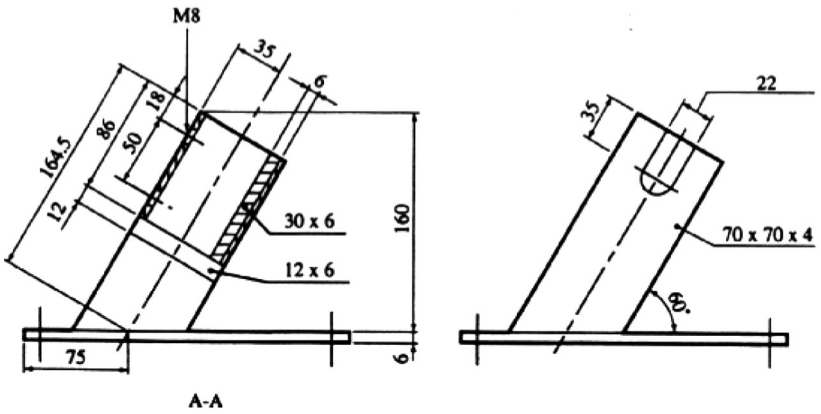
(A) Telo tlakovej nádoby	(B) Uzatvárací nástavec s poistným diskom	(C) Zážihový nástavec
(D) Podložka z mäkkého olova	(E) Poistný disk	(F) Bočné rameno
(G) Hlava snímača tlaku	(H) Tesnenie	(J) Izolovaná elektróda
(K) Uzemňovacia elektróda	(L) Izolácia	(M) Oceľový kónus
(N) Deformačná drážka tesnenia		

▼B

Obrázok 2

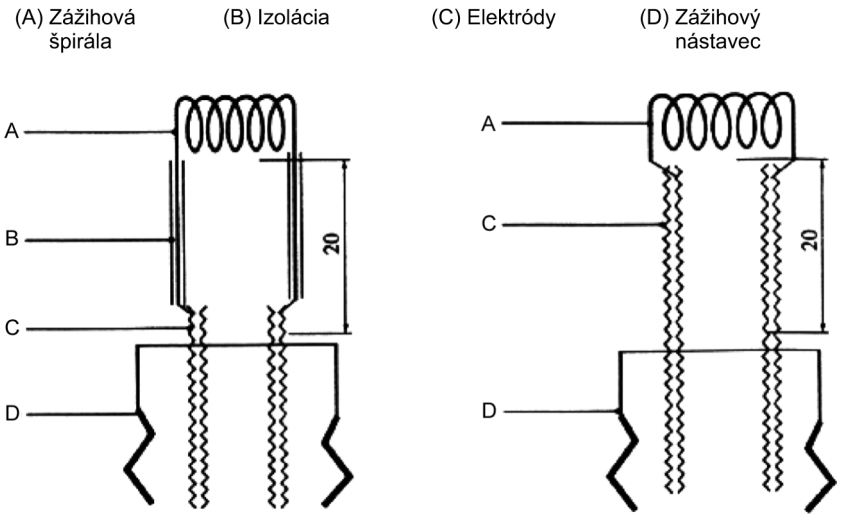
Stojan





Obrázok 3

Systém zážihu



Poznámka: Môže sa použiť ktorákoľvek z týchto zostáv.

▼M1

A.22. DĹŽKOVÁ HODNOTA GEOMETRICKÉHO VYJADRENIA PRIEMERU VLÁKEN

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Táto metóda opisuje postup merania dĺžkovej hodnoty geometrického vyjadrenia priemeru (Length Weighted Geometric Mean Diameter – LWGMD) objemu umelých minerálnych vláken (Man Made Mineral Fibres – MMMF). Keďže hodnota LWGMD štatistického súboru sa bude s 95 % pravdepodobnosťou nachádzať medzi 95 % hladinami spoľahlivosti vzorky (t. j. LWGMD ± 2 štandardné chyby), vykazovaná hodnota (testovacia hodnota) bude na nižšej úrovni 95 % hladiny spoľahlivosti (napríklad LWGMD – dve štandardné chyby). Metóda je založená na aktualizácii (jún 1994) návrhu postupu HSE (Health and Safty Executive – Výkonný výbor pre zdravie a bezpečnosť), ktorý bol prijatý 26. septembra 1993 na stretnutí medzi ECFIA (European Ceramic Fibres Industry Association – Európska asociácia odvetví priemyselných vláken) a HSE v Chesteri a bol vyvinutý pri druhej medzilaboratórnej skúške (1,2). Táto metóda merania sa môže používať na určenie priemeru vlákna látok výrobkov obsahujúcich MMMF vrátane ohňovzdorných keramických vláken (RCF), umelých sklovitých vláken (MMVF), kryštalických a polykryštalických vláken.

Dĺžková hmotnosť vyjadruje nahradenie vplyvu rozloženia na priemer v dôsledku porušenia dlhých vláken počas odoberania, prípadne narábania s materiálom. Geometrická štatistika (geometrická hodnota) sa používa na meranie miery rozloženia MMMF priemerov, pretože tieto priemery mávajú zvyčajne veľkosť rozloženia, ktorá sa približuje k normálnej polohe.

Meranie dĺžky, ako aj priemeru je zdĺhavé a zároveň časovo náročné, ale ak sa merajú len tie vlákna, ktoré sa plynulo dotýkajú tenkou čiarou poľa SEM pohľadu, potom je pravdepodobnosť výberu daného vlákna pomerná k jeho dĺžke. Takto sa určí dĺžka pri výpočtoch dĺžkových hodnôt, pričom jedinou požadovanou hodnotou je veľkosť priemeru, a LWGMD-2SE sa môže vypočítať, ako bolo uvedené.

1.2. POJMY

Zrno: predmet s pomerom dĺžky k šírke menej ako 3:1.

Vlákno: Predmet s pomerom dĺžky k šírke (pomer strán) menej ako 3:1.

1.3. ROZSAH A OBMEDZENIA

Metóda sa zameriava na zobrazenie rozloženia priemeru, ktorý má strednú hodnotu od 0,5 μm do 6 μm. Väčšie priemery sa môžu zmerať s použitím menšieho zvýšenia SEM, ale táto metóda bude značne obmedzená pri jemnejšom rozložení vlákna a meranie pomocou TEM (mikroskop prenosu elektrónov) sa odporúča v prípade, ak je stredná hodnota priemeru nižšia ako 0,5 μm.

▼M1

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Určité množstvo reprezentatívnej vzorky sa odoberie z vlákninovej zóny alebo voľne uloženého vlákna. Voľné vlákna sa skrátia s použitím postupu drvenia a reprezentatívna časť vzorky sa rozptýli vo vode. Hmota sa potom oddelí a prefiltruje polykarbonátovým filtrom cez sito s okami veľkosti 0,2 μm a pripraví na skúšku s použitím techniky skenovacieho elektrónového mikroskopu (SEM). Priemer vláken sa odmeria na 10 000-násobne zväčšenej obrazovke, prípadne väčšom zväčšení ([1]) s použitím metódy priesečníka, ktorá poskytne nestranný odhad strednej hodnoty priemeru. Vypočíta sa spodná hodnota 95 % intervalu spoľahlivosti (na základe jednostranného testu) a stanoví sa odhad najnižšej hodnoty geometrického vyjadrenia priemeru vláken materiálu.

1.5. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.5.1. **Bezpečnostné opatrenia**

Priamy kontakt s jemnými vláknami sa musí obmedziť na minimum a pri narábaní so suchými vláknami je nutné používať digestor alebo odkladaciu skrinku. Pravidelné monitorovanie kontaktu s látkami sa vykonáva na účel stanovenia efektívnosti kontrolných metód. Pri narábaní s MMMF je nevyhnutné používať rukavice na jednorazové použitie, aby sa predišlo podráždeniu pokožky a zabránilo krížovej kontaminácii (nakazeniu).

1.5.2. **Prístroje/zariadenia**

— lis a farbivo (schopný vyprodukovať tlak 10 Mpa),

— polykarbonátové kapilárne pórovité filtre s veľkosťou pórov 0,2 μm (priemer 25 mm),

— membránový celulózový filter s veľkosťou pórov 5 μm, určený ako pomocný filter,

— sklený filtračný prístroj (alebo jednorazové filtračné systémy) umožňujúce požitie filtrov s priemerom 25 mm (napríklad milipórová sklená mikroanalýzová sada, typ č. XX10 025 00),

— čistá destilovaná voda získaná prefiltrovaním cez filter s veľkosťou pórov 0,2 μm na účely odstránenia mikroorganizmov,

— katódový rozprašovač s anódou zo zlata, prípadne zo zlata či paládia,

— skenovací (rastrovací) elektrónový mikroskop s rozlišovacou schopnosťou do 10 nm a pracujúci s 10 000-násobným zväčšením,

— rôzne: stierky, skalpel s čepeľou typu 24, klieštičky, SEM tubusy, karbónové lepidlo alebo karbónová lepiaca páska, strieborný skalpel,

— ultrazvuková sonda alebo ultrazvuková vanička na doske laboratórneho stola,

— odoberač vzorky sedimentov alebo korkovrt na odoberanie vzoriek z pokrývky MMMF.

([1]) Táto hodnota zväčšenia sa uvádza pre vlákna s priemerom 3 μm, pre vlákna s priemerom 6 μm je vhodnejšie 5 000-násobné zväčšenie.

▼M1

1.5.3. **Postup pri teste**

1.5.3.1. *Odber vzoriek*

Pri vrchných vrstvách sa na odoberanie vzoriek profilu použije 25 mm odoberač vzorky sedimentov alebo korkovrt. Mali by byť rovnomerne rozmiestnené po šírke z kratšej strany vrstvy alebo v prípade, že sú k dispozícii dlhé dĺžky vrstiev, sa odoberú z náhodných častí. Rovnaké zariadenie možno použiť na náhodné odoberanie vzoriek z uvoľnených vláken. Malo by sa odobrať šesť vzoriek, aby sa zohľadnili priestorové odchýlky objemu materiálu.

Šesť vzoriek jadra sa pod tlakom 10 Mpa rozdrví v lisovadle s priemerom 50 mm. Materiál sa rozmieša pomocou stierky a znovu sa lisuje pod tlakom 10 Mpa. Potom sa materiál odoberie z lisovadla a uskladní v hermeticky uzatvorenej sklenej fľaši.

1.5.3.2. *Príprava vzorky*

V nutnom prípade sa organický tmel odstráni umiestnením vlákna dovnútra pece pri teplote 450 °C počas približne jednej hodiny.

Vytvarujte vzorku do kužeľa a rozštvrťte ju (vykonáva sa vnútri prachovej skrinky).

S použitím stierky pridajte malé množstvo (< 0,5 g) vzorky do 100 ml čerstvo destilovanej vody, ktorá bola prefiltrovaná pomocou membránového filtra veľkosti 0,2 µm (ak sa použitie ukáže opodstatnené, možno použiť náhradný zdroj ultračistej vody). Dôkladne rozmiešajte s použitím ultrazvukovej sondy poháňanej 100 W zdrojom a nastavenej tak, aby sa vytvorila kavitácia. (V prípade, že sonda nie je k dispozícii, použite nasledujúcu metódu: 30 sekúnd ju treba opakovane triasť a obracať; nechať 5 minút pôsobiť pod ultrazvukom umiestnením v stolnej ultrazvukovej vaničke; potom opakovane triasť a obracať počas ďalších 30 sekúnd.)

Okamžite po rozptýlení vlákna je potrebné odobrať niekoľko častíc (napríklad tri pomerné časti 3,6 a 10 ml) pomocou širokootvorovej pipety (s objemom 2 – 5 ml).

Prefiltrujte každú časť cez polykarbonátový filter veľkosti otvorov 0,2 µm s pomocou MEC filtru veľkosti pórov 5 µm s použitím 25 ml skleného filtrovacieho lievika s valcovitým zásobníkom. Približne 5 ml prefiltrovanej destilovanej vody by sa malo umiestniť do lievika a častica sa pomaly prekvapkáva do vody, držiac konček pipety pod ohybom. Pipeta a zásobník sa po prekvapkávaní musia riadne prepláchnuť z toho dôvodu, že vlákna sa zvyčajne nachádzajú viac na povrchu.

Opatrne odoberte filter a pred umiestnením do sušiacej nádoby ho oddeľte od podporného filtra.

▼M1

Kmitavým pohybom narežte štvrtinu alebo polovicu z prefiltrovanej hmoty s použitím skalpovacej čepele typu 24. Opatrne pripevnite oddelenú časť k bloku SEM s s použitím lepiaceho uhlíkového štítka alebo uhlíkového lepidla. Použite strieborný skalpel najmenej v troch polohách tak, aby sa zlepšil elektrický kontakt okrajov filtra a ústrižku. Keď lepidlo/strieborný skalpel oschne, obaľte katódu vrstvou 50 nm zlata, prípadne zmesou zlata/paládia na povrchu usadeniny.

1.5.3.3. *SEM kalibrácia a postup*

1.5.3.3.1. Kalibrácia

SEM kalibráciu je potrebné skontrolovať najmenej raz do týždňa (najlepšie každodenne) s použitím certifikovanej kalibračnej mriežky. Kalibráciu je nutné porovnať s certifikovanou normou a v prípade, ak meraná hodnota (SEM) nie je v rozpätí ± 2 % certifikovanej hodnoty, musí sa kalibrácia SEM upraviť a znovu skontrolovať.

SEM by malo byť schopné rozpustiť prinajmenšom viditeľný priemer 0,2 μm s použitím absolútnej vzorkovej matrice pri 2 000-násobnom zväčšení.

1.5.3.3.2. Pracovný postup

Proces SEM sa vykonáva pri 10 000-násobnom zväčšení ([1]) za podmienok, ktoré umožňujú dobrú rozlíšiteľnosť prostredníctvom obrazu pri nízkych hodnotách skenovania, napríklad 5 sekúnd na snímku. Napriek tomu, že pracovné podmienky pri rôznych SEM sa môžu odlišovať, všeobecne platí, že na získanie najlepšej viditeľnosti a rozlíšenia je pri použití relatívne malého objemu hmoty atómov potrebné použiť zvyšujúce sa napätie od 5 – 10 keV pomocou malého bodového nastavenia a krátkej prevádzkovej vzdialenosti. Pri realizácii lineárneho priečneho pohybu sa musí použiť 0^{o} sklon na účely minimalizovania opätovného zaostrenia alebo ak sa SEM nachádza v eucentrickej polohe, použije sa eucentrická prevádzková vzdialenosť. Menšie zväčšenie možno použiť v prípade, ak materiál neobsahuje vlákna s malým priemerom, a pre vlákna s väčším priemerom (> 5 μm).

1.5.3.4. *Meranie veľkosti*

1.5.3.4.1. Zhodnotenie vzorky preskúšaním pri malom zväčšení

Najskôr sa vzorka preskúša pri malom zväčšení, aby sa zistil zhluk väčších vláken a ich hustota. V prípade nadmerného zhlukovania vláken sa odporúča pripraviť novú vzorku.

Štatistická presnosť si vyžaduje meranie minimálneho počtu vláken, pričom vysoká hustota vláken je výhodnejšia, pretože preskúšavanie prázdnych polí je časovo náročné a nepredstavuje prínos k celkovej analýze. Ak je filter preplnený, meranie všetkých merateľných vláken sa stáva náročným a malé vlákna môžu byť vynechané, lebo sú prekryté väčšími.

([1]) Pri vláknach 3 μm pozri predchádzajúcu poznámku.

▼M1

Ku skresleniu výsledkov nadhodnotením LWGMD môže dôjsť, ak je hustota vláken väčšia ako 150 vláken na milimeter lineárneho priečneho posunu. Na druhej strane nízka koncentrácia vláken zvyšuje čas analýzy a často je efektívnejšie pripraviť vzorku s hustotou vláken bližšou optimálnej hodnote, ako sa spoliehať na vlákna s nízkou koncentráciou. Optimálna hustota vláken sa určuje na základe priemeru jedného alebo dvoch počítateľných vláken na polia zo záberu pri 5 000-násobnom zväčšení. Napriek tomu optimálna hustota závisí od veľkosti (priemeru) vláken, takže laborant pri rozhodovaní, či hustota vlákna je blízko k optimálnej hodnote, alebo nie, musí použiť vlastný odborný úsudok.

1.5.3.4.2. Meranie dĺžky priemeru vláken

Počítajú sa iba tie vlákna, ktoré sa dotýkajú (alebo prečnievajú) tenkej (plynulej) čiary naznačenej na obrazovke SEM. Na tento účel sa nakreslí horizontálna (alebo vertikálna) čiara idúca stredom obrazovky.

Alternatívou sa ukazuje byť možnosť umiestnenia jednotlivého bodu do stredu obrazovky s plynulým skenovaním jedným smerom krížom cez celý filter. Každé vlákno s koeficientom s priemerom 3:1, ktoré sa dotýka tohto bodu alebo ho presahuje, sa potom zmeria a zaznamená.

1.5.3.4.3. Triedenie vláken

Odporúča sa odmerať minimálne 300 vláken. Každé vlákno sa odmeria iba raz v priesečníku s čiarou alebo bodom nakresleným na obraze (alebo blízko k priesečníku, ak sú okraje vlákna prekryté). Ak sa objavia vlákna, ktoré majú nerovnomerné priečne rezy, je potrebné použiť rozmer reprezentujúci priemernú hodnotu priemeru vlákna. Opatrne treba určiť presný okraj a odmerať najkratšiu vzdialenosť medzi okrajmi vlákna. Triedenie možno realizovať online alebo offline s použitím uložených obrázkov alebo fotografií. Vzhľadom na úsporu času a zamedzenie chýb pri prepise, ako aj kvôli zautomatizovaniu samotného výpočtu sa odporúča použiť poloautomatizovaný snímkovací systém merania, ktorý je schopný stiahnuť údaje priamo do tabuľkovej formy.

Konce dlhých vláken je potrebné preveriť pri nízkej hodnote zväčšenia, aby sa zamedzilo ich opätovnému zvlneniu do zorného poľa merania a zabezpečilo, že sa odmerajú iba raz.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Priemery vláken zvyčajne nemajú normálne rozloženie. Napriek tomu možno získať pri logaritmickej transformácii rozloženie, ktoré sa približuje k normálnemu stavu.

Výpočet aritmetickej hodnoty (stredná hodnota lnD) a štandardnej odchýlky (SD_{lnD}) od prenosu základne hodnôt e (lnD) z priemerov vláken (D).

$$\text{stredná lnD} = \frac{\sum \text{lnD}}{n} \qquad (1)$$

▼M1

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\Sigma(lnD - \text{stredná } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Štandardná odchýlka sa vydelí druhou odmocninou počtu meraní (n), čím vyrátame štandardnú chybu (SE_{lnD}).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Odpočítajte dvakrát štandardnú chybu od hodnoty a vypočítajte exponenciál tejto hodnoty (stredná hodnota mínus dve štandardné chyby) a dostanete strednú geometrickú hodnotu mínus dve štandardné chyby.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{stredná } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **NAHLASOVANIE SPRÁV**

PROTOKOL O TESTE

Protokol o teste musí obsahovať aspoň nasledujúcu informáciu:

— hodnotu LWGMD-2SE,

— všetky odchýlky a zvlášť tie, ktoré môžu mať vplyv na presnosť a správnosť výsledkov s patričným zdôvodnením.

4. **LITERATÚRA**

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. ROZDEĽOVACÍ KOEFICIENT (1-OKTANOL/VODA): METÓDA POMALÉHO MIEŠANIA

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov (TG) 123 (2006). Hodnoty rozdeľovacieho koeficientu 1-oktanol/voda (P_{ow}) až po log P_{ow} 8,2 boli presne stanovené metódou pomalého miešania (1). Ide preto o vhodný experimentálny prístup pre priame stanovenie P_{ow} vysoko hydrofóbnych látok.

2. Inými metódami na stanovenie rozdeľovacieho koeficientu 1-oktanol/voda (P_{ow}) sú metóda trepačkovej banky (2) a stanovenie P_{ow} z retenčného správania HPLC s reverznou fázou (3). Pri metóde trepačkovej banky sa zvyknú tvoriť vedľajšie produkty z dôvodu prenosu oktanolových mikrokvapôčok do vodnej fázy. S narastajúcimi hodnotami P_{ow} vedie prítomnosť týchto kvapôčok vo vodnej fáze k čoraz vyššiemu nadhodnoteniu koncentrácie testovanej látky vo vode. Preto sa jej použitie obmedzuje na látky s log $P_{ow} < 4$. Druhá metóda sa opiera o spoľahlivé údaje priamo stanovených hodnôt P_{ow} na kalibráciu vzťahu medzi retenčným správaním HPLC a meranými hodnotami P_{ow}. Na stanovenie rozdeľovacích koeficientov 1-oktanol/voda ionizovateľných látok (4) bolo možné použiť predbežné usmernenia OECD, ktoré sa však už nebudú používať.

3. Túto testovaciu metódu vyvinuli v Holandsku. Presnosť metód, ktoré sú tu opísané, bola potvrdená a optimalizovaná v rámci hodnotiacej štúdie kruhového testu, na ktorej sa zúčastnilo 15 laboratórií (5).

ÚVODNÉ ÚVAHY

Význam a použitie

4. V prípade inertných organických látok boli zistené veľmi dôležité vzťahy medzi rozdeľovacími koeficientmi 1-oktanol/voda (P_{ow}) a ich bioakumuláciou v rybách. Okrem toho sa preukázala korelácia P_{ow} s toxicitou rýb, ako aj sorpcia chemikálií do tuhých látok, ako je zemina a sedimenty. Rozsiahly prehľad vzťahov sa uvádza v odkaze (6).

5. Medzi rozdeľovacím koeficientom 1-oktanol/voda a vlastnosťami iných látok bola zistená široká škála vzťahov, ktoré majú význam pre environmentálnu toxikológiu a chémiu. V dôsledku toho sa rozdeľovací koeficient 1-oktanol/voda stal kľúčovým parametrom pri hodnotení environmentálneho rizika chemikálií, ako aj pri predpovedaní osudu chemikálií v životnom prostredí.

Rozsah

6. Pri pokuse pomalého miešania sa predpokladá nižšia tvorba mikrokvapôčok z kvapiek 1-oktanolu vo vodnej fáze. Následne nedochádza k nadhodnoteniu vodnej koncentrácie v dôsledku molekúl testovanej látky, ktoré súvisí s takýmito kvapôčkami. Metóda pomalého miešania je preto veľmi vhodná na stanovenie P_{ow} látok s predpokladanými hodnotami log P_{ow} rovnajúcimi sa 5 alebo vyššími, v prípade ktorých zvykne metóda trepačkovej banky (2) viesť k chybným výsledkom.

▼M4

VYMEDZENIE POJMU A JEDNOTKY

7. Rozdeľovací koeficient látky medzi vodou a lipofilickým rozpúšťadlom (1-oktanol) charakterizuje rozloženie rovnováhy chemikálie medzi dvoma fázami. Rozdeľovací koeficient medzi vodou a 1-oktanolom (P_{OW}) je vymedzený ako pomer rovnovážnych koncentrácií testovanej látky v 1-oktanole nasýtenom vodou (C_O) a vo vode nasýtenej 1-oktanolom (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Keďže ide o pomer, je to bezrozmerné číslo. Najčastejšie sa udáva ako logaritmus pri základe 10 (log P_{ow}). P_{ow} závisí od teploty a údaje v správe by mali zahŕňať teplotu merania.

PRINCÍP METÓDY

8. Na účely stanovenia rozdeľovacieho koeficientu sa voda, 1-oktanol a testovaná látka navzájom vyvážia pri konštantnej teplote. Následne sa určia koncentrácie testovanej látky v dvoch fázach.

9. Problémy pokusu súvisiace s tvorbou mikrokvapôčok počas pokusu s trepaním banky je možné znížiť pri pokuse s pomalým miešaním, ktorý sa v tomto texte navrhuje. V prípade pokusu s pomalým miešaním sa voda, 1-oktanol a testovaná látka vyvážia v termostatickom miešanom reaktore. Výmena medzi fázami sa urýchli miešaním. Miešaním dochádza k malej turbulencii, ktorá napomáha výmene medzi 1-oktanolom a vodou bez vytvárania mikrokvapôčok (1).

POUŽITEĽNOSŤ TESTU

10. Keďže prítomnosť látok iných ako testovaná látka môže ovplyvniť koeficient aktivity testovanej látky, testovaná látka sa musí testovať ako čistá látka. Pri pokuse stanovenia rozdeľovacieho koeficientu 1-oktanol/voda sa použije komerčne dostupná látka najvyššej čistoty.

11. Uvedená metóda sa vzťahuje na čisté látky, ktoré nedisociujú ani sa nespájajú a ktoré nevykazujú významnú medzipovrchovú aktivitu. Možno ju použiť na stanovenie rozdeľovacieho koeficientu 1-oktanol/voda takýchto látok a zmesí. Ak sa metóda použije v prípade zmesí, stanovené rozdeľovacie koeficienty 1-oktanol/voda sú závislé od chemického zloženia testovanej zmesi a elektrolytického zloženia vo vodnej fáze. Za predpokladu, že sa prijmú dodatočné opatrenia, možno metódu použiť aj na disociujúce alebo spájajúce sa zlúčeniny (odsek 12).

12. Vzhľadom na viacnásobné rovnovážne stavy vo vode a 1-oktanole, ktoré prispievajú k deleniu disociujúcich látok v systéme 1-oktanol/voda, ako sú organické kyseliny a fenoly, organické bázy a organokovové látky, je rozdeľovací koeficient 1-oktanol/voda závislou konštantou, ktorá vo veľkej miere závisí od elektrolytického zloženia (7) (8). Stanovenie rozdeľovacieho koeficientu 1-oktanol/voda preto vyžaduje, aby sa pH a elektrolytické zloženie počas pokusu kontrolovali a zaznamenali v správe. Pri hodnotení týchto rozdeľovacích koeficientov je potrebné opierať sa o odborný posudok. Pomocou hodnoty disociačnej konštanty (disociačných konštánt) je potrebné vybrať vhodné hodnoty pH, aby sa pre každý ionizačný stav stanovil rozdeľovací koeficient. Pri testovaní organokovových zlúčenín (8) sa musia použiť nekomplexujúce tlmivé roztoky. Pri zohľadnení existujúcich znalostí o roztokovej chémii (konštanty stability komplexu, disociačné konštanty) by sa podmienky pokusu mali zvoliť takým spôsobom, aby bolo možné odhadnúť zloženie testovanej látky vo vodnej fáze. Iónová sila by mala byť totožná pri všetkých pokusoch vzhľadom na použitie základného elektrolytu.

▼M4

13. Pri teste sa môžu vyskytnúť problémy v prípade testovania látok s nízkou rozpustnosťou vo vode alebo s vysokým P_{ow}, lebo koncentrácie vo vode sú také nízke, že je náročné ich stanoviť s presnosťou. V rámci tejto testovacej metódy sa uvádzajú usmernenia, ako tento problém riešiť.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

14. Chemické reagenty musia mať stupeň čistoty – analyticky čistá alebo musia byť čistejšie. Odporúča sa použitie neoznačkovaných testovacích látok so známym chemickým zložením a podľa možnosti aspoň 99 % čistoty alebo rádiooznačených testovaných látok so známym chemickým zložením a rádiochemickej čistoty. V prípade krátkeho polčasu rozpadu by sa mali aplikovať korekcie na rozpad. V prípade rádiooznačených testovaných látok by sa mala použiť analytická metóda pre konkrétnu chemikáliu, aby sa zabezpečilo, že meraná rádioaktivita priamo súvisí s testovanou látkou.

15. Odhad log P_{ow} je možné urobiť pomocou komerčne dostupného softvéru na odhadovanie log P_{ow} alebo pomocou pomeru rozpustností v oboch roztokoch.

16. Pred začatím pokusu s pomalým miešaním na stanovenie P_{ow} musia byť k dispozícii tieto informácie o testovanej látke:

a) štruktúrny vzorec;

b) vhodné analytické metódy na stanovenie koncentrácie látky vo vode a 1-oktanole;

c) disociačná konštanta/disociačné konštanty ionizovateľných látok [usmernenie OECD 112 (9)];

d) rozpustnosť vo vode (10);

e) abiotická hydrolýza (11);

f) ľahká biodegradovateľnosť (12);

g) tlak pary (13).

OPIS METÓDY

Zariadenie a prístroje

17. Vyžaduje sa štandardné laboratórne zariadenie, najmä:

— magnetické miešadlá a magnetické miešacie tyčinky pokryté teflónom sa používajú na miešanie vo vodnej fáze,

— analytické prístroje vhodné na stanovenie koncentrácie testovanej látky pri predpokladaných koncentráciách,

— miešacia nádoba s kohútikom na dne. V závislosti od odhadu log P_{ow} a detekčného limitu (LOD) testovanej zlúčeniny je potrebné zvážiť použitie reakčnej nádoby rovnakých geometrických tvarov s objemom vyšším ako jeden liter, aby bolo možné získať dostatočný objem vody na chemickú extrakciu a analýzu. To bude mať za následok vyššie koncentrácie vo vodnom extrakte, a teda spoľahlivejšie analytické stanovenie. Tabuľka s odhadmi minimálneho potrebného objemu, detekčným limitom zlúčeniny, odhadovaným log P_{ow} a rozpustnosťou zlúčeniny vo vode je uvedená v dodatku 1. Tabuľka vychádza zo vzťahu medzi log P_{ow} a pomerom medzi rozpustnosťou v oktanole a vo vode, ako uvádza Pinsuwan a kolektív (14):

$$\log P_{OW} = 0{,}88 \log SR + 0{,}41$$

▼M4

kde

$SR = S_{oct}/S_w$ (v molarite),

a vzťah podľa Lymana (15) na predpovedanie rozpustnosti vo vode. Rozpustnosť vo vode vypočítaná pomocou rovnice uvedenej v dodatku 1 sa považuje za prvý odhad. Treba poznamenať, že používateľ môže odhadnúť rozpustnosť vo vode na základe akéhokoľvek vzťahu, ktorý sa považuje za lepšie znázornenie vzťahu medzi hydrofobicitou a rozpustnosťou. V prípade tuhých zlúčenín sa napríklad odporúča zahrnutie bodu topenia do predpovede rozpustnosti. V prípade použitia upravenej rovnice sa treba uistiť, že rovnica na výpočet rozpustnosti v oktanole je stále platná. Schematické znázornenie miešacej nádoby so skleným plášťom s objemom približne jeden liter je uvedené v dodatku 2. Rozmery nádoby znázornenej v dodatku 2 sa ukázali byť vhodné a v prípade, že sa použije zariadenie inej veľkosti, by mali ostať zachované,

— prostriedky na udržanie konštantnej teploty počas pokusu s pomalým miešaním sú nevyhnutné.

18. Nádoby by mali byť vyrobené z inertného materiálu, aby bola adsorpcia na povrchu nádoby zanedbateľná.

Príprava testovacích roztokov

19. P_{ow} by sa mal stanoviť s využitím 1-oktanolu najvyššej čistoty, ktorý je komerčne dostupný (aspoň + 99 %). Odporúča sa purifikácia 1-oktanolu extrakciou pomocou kyseliny, bázy a vody a následné vysušenie. Okrem toho možno na purifikáciu 1-oktanolu použiť destiláciu. Purifikovaný 1-oktanol sa použije na prípravu štandardných roztokov testovaných látok. Voda, ktorá sa použije na stanovenie P_{ow}, by mala byť destilovaná zo skla alebo kremeňa, alebo získaná zo zariadenia na purifikáciu vody. Takisto je možné použiť vodu HPLC kvality. V prípade destilovanej vody sa vyžaduje filtrácia cez 0,22 μm filter. Mali by sa vykonať aj slepé pokusy na kontrolu, či sa v koncentrovaných extraktoch nenachádzajú žiadne prímesi, ktoré by mohli prísť do styku s testovanou látkou. Ak sa použije filter zo skleného vlákna, musí sa vyčistiť vypálením aspoň počas troch hodín pri teplote 400 °C.

20. Obe rozpúšťadlá sa pred pokusom navzájom nasýtia vyvažovaním v dostatočnej veľkej nádobe. Rovnováha sa dosiahne pomalým miešaním dvojfázového systému počas dvoch dní.

21. Zvolí sa vhodná koncentrácia testovanej látky, ktorá sa rozpustí v 1-oktanole (nasýtenom vodou). Rozdeľovací koeficient 1-oktanol/voda sa musí stanoviť v zriedených roztokoch v 1-oktanole a vode. Koncentrácia testovanej látky by preto v žiadnej fáze nemala presiahnuť 70 % svojej rozpustnosti s maximálnou koncentráciou 0,1 M (1). Roztoky 1-oktanolu použité pri pokuse nesmú obsahovať suspendovanú tuhú testovanú látku.

22. Vhodné množstvo testovanej látky sa rozpustí v 1-oktanole (nasýtenom vodou). Ak je odhad log P_{ow} vyšší ako päť, treba dbať na to, aby roztoky 1-oktanolu použité pri pokuse neobsahovali suspendovanú tuhú testovanú látku. Na tento účel sa v prípade chemikálií s odhadovanou hodnotou log $P_{ow} > 5$ postupuje takto:

— testovaná látka sa rozpustí v 1-oktanole (nasýtenom vodou),

▼M4

— roztoku sa poskytne dostatočný čas, aby sa suspendovaná tuhá látka usadila. Počas usádzania sa sleduje koncentrácia testovanej látky,

— potom, ako merané koncentrácie v roztoku 1-oktanolu dosiahnu stabilné hodnoty, sa zásobný roztok zriedi vhodným objemom 1-oktanolu,

— odmeria sa koncentrácia zriedeného zásobného roztoku. Ak nameraná koncentrácia zodpovedá zriedeniu, zriedený zásobný roztok možno použiť pri pokuse s pomalým miešaním.

Extrakcia a analýza vzoriek

23. Na skúšku testovanej látky sa použije platná analytická metóda. Výskumníci musia predložiť dôkazy o tom, že koncentrácie v 1-oktanole nasýtenom vodou, ako aj vo fáze vody nasýtenej 1-oktanolom počas pokusu sú vyššie ako kvantifikačný limit metódy použitých analytických postupov. Analytická výťažnosť testovanej látky z vodnej fázy a z 1-oktanolovej fázy sa musí stanoviť pred pokusom v tých prípadoch, v ktorých sú potrebné metódy extrakcie. Analytický signál musí byť korigovaný vzhľadom na slepé pokusy a treba dbať na to, aby nedošlo k prenosu analytu z jednej vzorky do druhej.

24. Pred analýzou bude pravdepodobne potrebná extrakcia vodnej fázy pomocou organického rozpúšťadla a prekoncentrácia extraktu z dôvodu pomerne nízkych koncentrácií hydrofóbnych testovaných látok vo vodnej fáze. Z toho istého dôvodu je nevyhnutné znížiť koncentrácie pri prípadných slepých pokusoch. Na tento účel treba použiť rozpúšťadlá vysokej čistoty, podľa možnosti rozpúšťadlá na analýzu rezíduí. Takisto práca s vopred dôkladne vyčisteným sklom (napr. umývanie rozpúšťadlom alebo vypaľovanie pri zvýšenej teplote) môže pomôcť zabrániť krížovej kontaminácii.

25. Odhad log P_{ow} možno získať z programu na odhadovanie alebo z odborného posudku. Ak je hodnota vyššia ako šesť, potom je potrebné dôkladne sledovať korekcie vzhľadom na slepé pokusy a prenos analytu. Podobne ak je odhad log P_{ow} vyšší ako šesť, je potrebné použiť náhradný štandard na korekciu výťažnosti, aby bolo možné dosiahnuť vysoké prekoncentračné faktory. Na odhadovanie log P_{ow} je k dispozícii množstvo komerčne dostupných softvérových programov ([1]), napr. Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) a ACD log P (19). Opisy postupov odhadovania sú uvedené v odkazoch (20 – 22).

26. Kvantifikačné limity (LOQ) na určenie testovanej látky v 1-oktanole a vo vode sa stanovia pomocou akceptovaných metód. Podľa štandardného pravidla možno kvantifikačný limit metódy stanoviť ako koncentráciu vo vode alebo v 1-oktanole, ktorej pomer signálu k šumu má hodnotu desať. Treba zvoliť vhodné metódy extrakcie a prekoncentrácie a takisto treba špecifikovať analytickú výťažnosť. Po analytickom stanovení sa vyberie vhodný prekoncentračný faktor s cieľom získať signál požadovanej veľkosti.

([1]) Táto informácia sa uvádza iba s cieľom pomôcť používateľom. Možno použiť iné rovnocenné počítačové programy, ak je možné preukázať, že sa nimi dosahujú rovnaké výsledky.

▼M4

27. Na základe parametrov analytickej metódy a predpokladaných koncentrácií sa určí približná veľkosť vzorky potrebná na presné stanovenie koncentrácie zlúčeniny. Treba sa vyhnúť používaniu vzoriek vody, ktoré sú príliš malé na získanie dostatočného analytického signálu. Takisto sa treba vyhnúť používaniu nadmerne veľkých vzoriek vody, lebo inak sa môže stať, že na minimálny požadovaný počet analýz (n = 5) ostane príliš málo vody. V dodatku 1 je minimálny objem vzorky uvedený ako funkcia objemu nádoby, LOD testovanej látky a rozpustnosti testovanej látky.

28. Kvantifikácia testovanej látky sa vykonáva porovnaním s kalibračnými krivkami príslušnej zlúčeniny. Koncentrácie v analyzovaných vzorkách musia byť ohraničené koncentráciami štandardov.

29. V prípade testovaných látok s odhadovaným log P_{ow} vyšším ako šesť treba náhradný štandard pridať do vzorky vody pred extrakciou s cieľom zaregistrovať straty, ku ktorým došlo v priebehu extrakcie a prekoncentrácie vzoriek vody. S cieľom zabezpečiť presnú korekciu výťažnosti musia mať náhradné látky vlastnosti, ktoré sú veľmi podobné alebo totožné s vlastnosťami testovanej látky. Na tento účel sa uprednostňuje použitie (stabilných) izotopicky označených analógov k skúmaným látkam (napríklad perdeuterovaných alebo označených uhlíkom ^{13}C). Ak nie je možné použiť označené stabilné izotopy, t. j. ^{13}C alebo ^{2}H, treba na základe spoľahlivých údajov z literatúry preukázať, že fyzikálno-chemické vlastnosti náhradnej látky sú veľmi podobné fyzikálno-chemickým vlastnostiam testovanej látky. V priebehu extrakcie kvapaliny kvapalinou vo vodnej fáze môže dôjsť k tvorbe emulzií. Možno ich redukovať pridaním soli a umožnením, aby sa emulzia počas noci usadila. Metódy používané na extrahovanie a prekoncentráciu vzoriek treba uviesť do správy.

30. Vzorky získané z 1-oktanolovej fázy možno pred analýzou v prípade potreby zriediť vhodným rozpúšťadlom. Okrem toho sa použitie náhradných štandardov na korekciu výťažnosti odporúča v prípade látok, pri ktorých pokusy s výťažnosťou preukázali vysoký stupeň variácie (relatívna smerodajná odchýlka > 10 %).

31. Podrobné informácie o analytickej metóde sa musia uviesť v správe. Tieto informácie zahŕňajú metódu extrakcie, prekoncentračné a zrieďovacie faktory, parametre prístrojov, postup kalibrácie, rozsah kalibrácie, analytickú výťažnosť testovanej látky z vody, pridanie náhradných štandardov na korekciu výťažnosti, hodnoty slepých pokusov, detekčné limity a kvantifikačné limity.

Realizácia testu

Optimálne pomery objemov 1-oktanol/voda

32. Pri voľbe objemov vody a 1-oktanolu by sa mali zohľadniť LOQ v 1-oktanole a vo vode, prekoncentračné faktory použité pri vzorkách vody, objemy vzoriek 1-oktanolu a vody a predpokladané koncentrácie. Z experimentálnych dôvodov by sa mal objem 1-oktanolu v systéme pomalého miešania zvoliť tak, aby vrstva 1-oktanolu bola dostatočne hrubá (> 0,5 cm) a umožňovala odber vzoriek počas 1-oktanolovej fázy bez jej narušenia.

33. Bežné fázové pomery používané na stanovenie zlúčenín s log P_{ow} rovnajúcim sa 4,5 alebo vyšším sú 20 – 50 ml 1-oktanolu a 950 – 980 ml vody v litrovej nádobe.

▼M4

Podmienky testovania

34. V priebehu testu sa reakčná nádoba tepelne stabilizuje, aby teplota nekolísala o viac ako 1 °C. Skúška sa vykonáva pri teplote 25 °C.

35. Pokusný systém by mal byť chránený pred denným svetlom buď tak, že sa pokus vykoná v tmavej miestnosti, alebo tak, že sa reakčná nádoba prikryje hliníkovou fóliou.

36. Pokus by sa mal vykonať v bezprašnom prostredí (pokiaľ je to možné).

37. Systém 1-oktanol-voda sa mieša, až kým sa nedosiahne rovnováha. Pri pilotnom pokuse sa posúdi dĺžka obdobia vyvažovania vykonaním pokusu s pomalým miešaním a pravidelným odberom vzorky vody a 1-oktanolu. Medzi jednotlivými odbermi vzoriek by malo uplynúť minimálne päť hodín.

38. Pri každom stanovení P_{ow} treba vykonať najmenej tri nezávislé pokusy s pomalým miešaním.

Stanovenie času dosiahnutia rovnováhy

39. Predpokladá sa, že rovnováha sa dosiahne, keď regresná funkcia pomeru koncentrácie 1-oktanol/voda v závislosti od času v priebehu štyroch časových bodov dosiahne sklon, ktorý sa pri hladine významnosti alfa 0,05 výrazne nelíši od nulového sklonu. Minimálny čas dosiahnutia rovnováhy je jeden deň pred začatím odberov vzoriek. Podľa štandardného pravidla sa môžu vzorky látok s odhadovaným log P_{ow} nižším ako päť odoberať počas druhého a tretieho dňa. Môže sa stať, že vyvažovanie sa bude musieť v prípade hydrofóbnych zlúčenín predĺžiť. V prípade zlúčeniny s log P_{ow} 8,23 (dekachlórbifenyl) stačilo na dosiahnutie rovnováhy 144 hodín. Rovnováha sa posudzuje prostredníctvom opakovaného odberu z jednej nádoby.

Začiatok pokusu

40. Na začiatku pokusu sa reakčná nádoba naplní vodou nasýtenou 1-oktanolom. Na dosiahnutie stálej teploty by mal byť k dispozícii dostatok času.

41. Do reakčnej nádoby sa opatrne pridá želané množstvo testovanej látky (rozpustené v požadovanom objeme 1-oktanolu nasýtenom vodou). Tento krok je v rámci pokusu veľmi dôležitý, lebo je potrebné vyhnúť sa prudkému miešaniu dvoch fáz. Na tento účel možno 1-oktanolovú fázu pomaly pipetou preniesť na stenu testovacej nádoby blízko hladiny vody. Tá následne stečie po sklenej stene a vytvorí nad vodnou fázou film. Vždy treba zabrániť tomu, aby 1-oktanol stekal priamo do banky. Kvapky 1-oktanolu by nemali padať priamo do vody.

42. Po začatí miešania sa rýchlosť miešania pomaly zvyšuje. Ak miešacie motory nemožno vhodne nastaviť, treba uvažovať nad použitím transformátora. Rýchlosť miešania sa nastaví tak, aby sa na rozhraní medzi vodou a 1-oktanolom vytvoril vír s hĺbkou od 0,5 cm do maximálne 2,5 cm. Rýchlosť miešania by sa mala znížiť, ak hĺbka víru presiahne 2,5 cm. V opačnom prípade sa z kvapôčok 1-oktanolu vo vodnej fáze môžu vytvoriť mikrokvapôčky, čo bude mať za následok nadhodnotenie koncentrácie testovanej látky vo vode. Maximálna rýchlosť miešania pri hĺbke 2,5 cm je odporúčaná na základe zistení potvrdzujúcej štúdie kruhového testu (5). Ide o kompromis medzi rýchlym dosiahnutím rovnováhy a zamedzením tvorbe 1-oktanolových mikrokvapôčok.

▼**M4**

Odber a spracovanie vzoriek

43. Miešadlo sa pred odobratím vzoriek vypne a počká sa, kým pohyb kvapalín neustane. Po dokončení odberu vzorky sa miešadlo opäť pomaly spustí, ako je opísané vyššie, a následne sa rýchlosť miešania bude postupne zvyšovať.

44. Pri vodnej fáze sa vzorka odoberie z uzatváracieho kohútika na dne reakčnej nádoby. Vždy je potrebné odstrániť mŕtvy objem vody v kohútikoch (približne 5 ml v prípade nádoby znázornenej v dodatku 2). Voda v kohútikoch sa nemieša, a preto nie je v rovnováhe s hlavným objemom. Zaznamenajte objem vzoriek vody a uistite sa, že množstvo testovanej látky prítomnej v odstránenej vode sa zohľadní pri nastavovaní hmotnostnej bilancie. Straty vznikajúce pri odparovaní by sa mali minimalizovať, a to tak, že sa umožní, aby voda pokojne stiekla do oddeľovacieho lievika, čím sa zabráni narušeniu vrstvy voda/1-oktanol.

45. Vzorky 1-oktanolu sa získajú odobratím malej alikvotnej časti (cca. 100 µl) z vrstvy 1-oktanolu 100-mikrolitrovou skleneno-kovovou striekačkou. Treba dbať na to, aby sa nenarušila hranica. Objem odobratej vzorky kvapaliny sa zaznamená. Malá alikvotná časť je postačujúca, lebo vzorka 1-oktanolu sa zriedi.

46. Treba sa vyhnúť zbytočným prenosom vzorky. Na tento účel by sa objem vzorky mal stanoviť gravimetricky. V prípade vzoriek vody to možno dosiahnuť sústredením vzorky vody v oddeľovacom lieviku, ktorý už obsahuje požadovaný objem rozpúšťadla.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

47. Podľa tejto testovacej metódy sa P_{ow} stanoví vykonaním troch pokusov s pomalým miešaním (tri pokusné jednotky) so skúmanou zlúčeninou pri totožných podmienkach. Regresia použitá na preukázanie dosiahnutia rovnováhy by mala vychádzať z výsledkov aspoň štyroch stanovení C_O/C_W v po sebe nasledujúcich časových bodoch. Tým sa umožní výpočet rozptylu ako ukazovateľa neistoty priemernej hodnoty získanej v prípade každej pokusnej jednotky.

48. P_{ow} je možné charakterizovať rozptylom údajov získaných pre každú pokusnú jednotku. Tieto informácie sa použijú na výpočet P_{ow} ako váženého priemeru výsledkov jednotlivých pokusných jednotiek. Na tento účel sa ako váha použije inverzná funkcia rozptylu výsledkov získaných z pokusných jednotiek. V dôsledku toho majú údaje s vysokou variáciou (vyjadrenou ako rozptyl), a teda nižšou spoľahlivosťou menší vplyv na výsledok ako údaje s nízkym rozptylom.

49. Analogicky sa vypočíta vážená smerodajná odchýlka. Tá vyjadruje opakovateľnosť merania P_{ow}. Nízka hodnota váženej smerodajnej odchýlky znamená, že stanovenie P_{ow} malo v rámci jedného laboratória vysokú opakovateľnosť. Formálne štatistické spracovanie údajov je vysvetlené ďalej.

▼M4

Spracovanie výsledkov

Preukázanie dosiahnutia rovnováhy

50. Logaritmus pomeru koncentrácie testovanej látky v 1-oktanole a vo vode [log (C_O/C_w)] sa vypočíta pri každom odbere vzorky. Dosiahnutie chemickej rovnováhy sa preukáže jej grafickým znázornením ako funkcie času. Horná hranica (plató) na tomto znázornení, ktoré je založené aspoň na štyroch po sebe nasledujúcich časových bodoch, ukazuje, že rovnováha bola dosiahnutá a že zlúčenina sa v 1-oktanole naozaj rozpustila. Ak to tak nie je, test musí pokračovať, až kým funkcia v priebehu štyroch po sebe nasledujúcich časových bodov nedosiahne sklon, ktorý sa pri hladine významnosti alfa 0,05 výrazne nelíši od nulového sklonu, čo znamená, že log C_o/C_w nie je závislý od času.

Log P_{ow} – výpočet

51. Hodnota log P_{ow} pokusnej jednotky sa vypočíta ako vážená priemerná hodnota log C_o/C_w tej časti krivky log C_o/C_w ako funkcie času, v ktorej sa preukázala rovnováha. Vážený priemer sa vypočíta vážením údajov inverznou funkciou rozptylu, aby bol vplyv údajov na konečný výsledok nepriamo úmerný neistote údajov.

Priemerný log P_{ow}

52. Priemerná hodnota log P_{ow} rôznych pokusných jednotiek sa vypočíta ako priemer výsledkov jednotlivých pokusných jednotiek vážený ich zodpovedajúcim rozptylom.

Výpočet je takýto:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

kde

$\log P_{ow,i}$ = hodnota log P_{ow} individuálnej pokusnej jednotky i,

$\log P_{ow,Av}$ = vážená priemerná hodnota individuálnych stanovení log P_{ow},

w_i = štatistická váha pripísaná hodnote log P_{ow} pokusnej jednotky i.

Recipročná hodnota rozptylu log $P_{ow,i}$ sa použije ako $w_i[w_i = var(\log P_{OW,i})^{-1}]$.

53. Chyba priemeru log P_{ow} sa odhadne ako opakovateľnosť log C_o/C_w stanovená počas fázy rovnováhy pri jednotlivých pokusných jednotkách. Je vyjadrená ako vážená smerodajná odchýlka log $P_{ow,Av}$ ($\sigma_{log\ Pow,Av}$), ktorá je zasa ukazovateľom chyby súvisiacej s log $P_{ow,Av}$. Váženú smerodajnú odchýlku možno vypočítať z váženého rozptylu ($var_{log\ Pow,Av}$) takto:

$$var_{log\ Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{log\ Pow,Av} = (var_{log\ Pow,Av})^{0,5}$$

Premenná n predstavuje počet pokusných jednotiek.

▼M4

Správa o teste

54. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— bežný názov, chemický názov, číslo CAS, štruktúrny vzorec, (s vyznačením polôh značkovania, ak sa používa značkovanie rádioaktívnym izotopom) a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti (pozri odsek 17),

— čistota (nečistoty) testovanej látky,

— čistota značky chemických látok značených rádioaktívnym izotopom a molárna aktivita (ak je to vhodné),

— predbežný odhad log P_{ow}, ako aj metóda použitá na odvodenie hodnoty.

Podmienky testovania:

— dátumy vykonávania štúdií,

— teplota počas pokusu,

— objem 1-oktanolu a vody na začiatku testu,

— objem odobratých vzoriek 1-oktanolu a vody,

— objem 1-oktanolu a vody, ktorý ostal v testovacích nádobách,

— opis použitých testovacích nádob a podmienok miešania (geometria miešacej tyčinky a testovacej nádoby, výška pri vortexovaní v mm a v prípade dostupnosti: rýchlosť miešania),

— použité analytické metódy na určenie testovanej látky a kvantifikačný limit metódy,

— časy odberu vzoriek,

— použité pH vodnej fázy a pufrovania, pričom pH je upravené pre ionizovateľné molekuly,

— počet paraleliek.

Výsledky:

— opakovateľnosť a citlivosť použitých analytických metód,

— určené koncentrácie testovanej látky v 1-oktanole a vode ako funkcia času,

— demonštrácia hmotnostnej bilancie,

— teplota a smerodajná odchýlka alebo rozsah teploty počas pokusu,

— regresia koncentračného pomeru v čase,

— priemerná hodnota log $P_{ow,Av}$ a jej štandardná chyba,

— rozbor a výklad výsledkov,

▼M4

— príklady nespracovaných údajov reprezentatívnej vzorky (všetky nespracované údaje musia byť uložené v súlade so štandardmi dobrej laboratórnej praxe) vrátane výťažnosti náhradných látok a počtu úrovní použitých pri kalibrácií (spolu s kritériami korelačného koeficientu kalibračnej krivky) a výsledkov zabezpečenia kvality a kontroly kvality (QA/QC),

— v prípade dostupnosti: potvrdzujúca správa o postupe skúšky (ktorá sa uvedie v odkazoch).

LITERATÚRA

1. De Bruijn, J. H. M., 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. Kapitola A.8 tejto prílohy, Rozdeľovací koeficient.

3. Kapitola A.8 tejto prílohy, Rozdeľovací koeficient.

4. OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paríž.

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, R. S., Mackay, D. (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

7. Schwarzenbach, R. P., Gschwend, P. M., Imboden, D. M. (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

8. Arnold, C. G., Widenhaupt, A., David, M. M., Müller, S. R., Haderlein, S. B., Schwarzenbach, R. P. (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol*. 31: 2 596 – 2 602.

9. OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paríž.

10. Kapitola A.6 tejto prílohy, Rozpustnosť vo vode.

11. Kapitola C.7 tejto prílohy, Degradácia – Abiotická degradácia: hydrolýza ako funkcia pH.

12. Kapitola C.4 – časť II – VII (metóda A až F) tejto prílohy, Stanovenie „ľahkej“ biodegradovateľnosti.

13. Kapitola A.4 tejto prílohy, Tlak pary.

14. Pinsuwan, S., Li A., a Yalkowsky, S. H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623 – 626.

15. Lyman, W. J. (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman, W. J., Reehl, W. F., Rosenblatt, D. H., Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 až 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, Budapešť.

19. ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

20. Lyman, W. J. (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman, W. J., Reehl, W. F., Rosenblatt, D. H., eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.

21. Rekker, R. F., de Kort, H. M. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther*. 14: 479 – 488.

22. Jübermann, O. (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386 – 390.

▼M4

Dodatok 1

Tabuľka na výpočet minimálnych objemov vody požadovaných na zistenie testovaných látok s rôznymi hodnotami log P_{ow} vo vodnej fáze

Predpoklady:

— Maximálny objem jednotlivých alikvotných častí = 10 % celkového objemu, 5 alikvotných častí = 50 % celkového objemu.

— Koncentrácia testovaných látok = 0,7 × rozpustnost v každej fáze. V prípade nižších koncentrácií sa vyžadujú väčšie objemy.

— Objem použitý na stanovenie detekčného limitu (LOD) = 100 ml.

— log P_{ow} oproti log S_w a log P_{ow} oproti SR (S_{oct}/S_w) primerane reprezentujú vzťahy testovaných látok.

Odhad S_w

log P_{ow}	Rovnica	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

Odhad S_{oct}

log P_{ow}	Rovnica	S_{oct} (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**

Celková hmotnosť testovanej látky (mg)	Hmotnosť$_{okt}$/ hmotnosť$_{voda}$	Hmotnosť$_{H2O}$ (mg)	Koncentrácia$_{H2O}$ (mg/l)	Hmotnosť$_{okt}$ (mg)	Koncentrácia$_{okt}$ (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

Výpočet objemov

Minimálny objem požadovaný pre fázu H_2O pri každej koncentrácii

log K_{ow}	LOD (mikrogramy/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
Objem použitý pri LOD l)	0,1					

Kľúč pre výpočty

Predstavuje < 10 % celkového objemu vodnej fázy, jednolitrová nádoba na ustálenie rovnováhy.

Predstavuje < 10 % celkového objemu vodnej fázy, dvojlitrová nádoba na ustálenie rovnováhy.

Predstavuje < 10 % celkového objemu vodnej fázy, päťlitrová nádoba na ustálenie rovnováhy.

Predstavuje < 10 % celkového objemu vodnej fázy, desaťlitrová nádoba na ustálenie rovnováhy.

Presahuje 10 % aj v prípade desaťlitrovej nádoby na ustálenie rovnováhy.

▼M4

Prehľad požadovaných objemov ako funkcia rozpustnosti vo vode a log P_{ow}

Minimálny objem požadovaný pre fázu H_2O pri každej koncentrácii LOD (ml)

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogramy/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

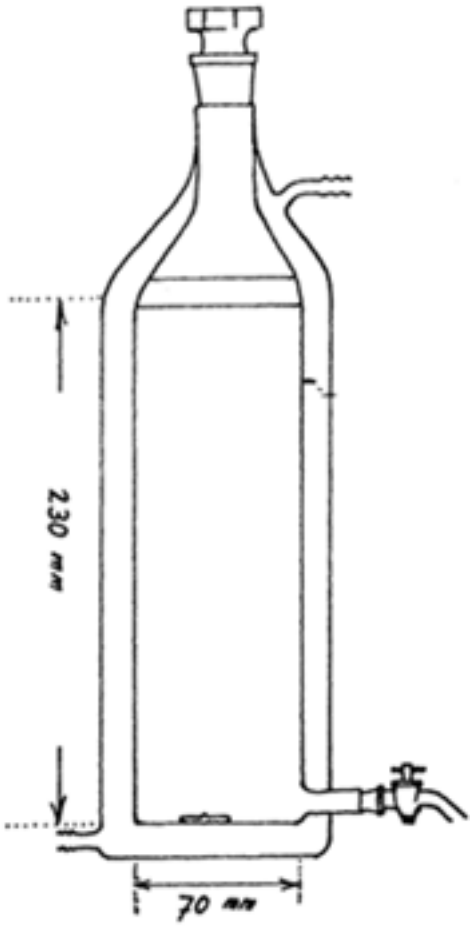
▼**M4**

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogramy/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
Objem použitý pre LOD l)		0,1					

▼M4

Dodatok 2

Príklad testovacej nádoby so skleným plášťom pre pokus s pomalým miešaním na stanovenie P_{ow}



▼M6

A.24. ROZDEĽOVACIA KONŠTANTA (N-OKTANOL/VODA), METÓDA VYSOKOÚČINNEJ KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

ÚVOD

Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 117 (2004).

1. Rozdeľovacia konštanta (P) je vymedzená ako pomer rovnovážnych koncentrácií rozpustenej látky v dvojfázovom systéme pozostávajúcom z dvoch do značnej miery nezmiešateľných rozpúšťadiel. V prípade n-oktanolu a vody platí:

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{oktanol}}{C_{\text{voda}}}$$

rozdeľovacia konštanta je podielom dvoch koncentrácií; je to bezrozmerná veličina a zvyčajne sa udáva vo forme dekadického logaritmu.

2. P_{ow} je kľúčovým parametrom v štúdiách osudu chemických látok v životnom prostredí. Bol preukázaný veľmi významný vzťah medzi P_{ow} neionizovanej formy látok a ich bioakumuláciou v rybách. Ukázalo sa tiež, že P_{ow} je užitočným parametrom pri predpovedaní adsorpcie, pokiaľ ide o pôdu a sedimenty a pri stanovovaní kvantitatívnych vzťahov štruktúry a aktivity pre širokú škálu biologických účinkov.

3. Pôvodný návrh tejto testovacej metódy vychádzal z článku, ktorý napísali C. V. Eadsforth and P. Moser (1). Vývoj testovacej metódy a medzilaboratórneho porovnávacieho testu OECD koordinoval Spolkový úrad pre životné prostredie (Umweltbundesamt) Spolkovej republiky Nemecko v roku 1986 (2).

ÚVODNÉ ÚVAHY

4. Hodnoty log P_{ow} v rozsahu od – 2 do 4 (príležitostne až 5 a viac) ([1]) je možné experimentálne stanoviť metódou trepačkovej banky (kapitola A.8 tejto prílohy; usmernenie OECD na vykonávanie testov 107). Metóda vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) sa používa pri hodnotách log P_{ow} v rozsahu od 0 do 6 [odkazy v literatúre (1), (2), (3), (4), (5)]. Táto metóda si môže vyžadovať odhad hodnoty P_{ow} na výber vhodných referenčných látok a na podopretie akýchkoľvek záverov vyvodených z údajov získaných pri teste. Výpočtové metódy sú stručne vysvetlené v dodatku k tejto testovacej metóde. Prevádzkový režim metódy HPLC je izokratický.

5. Hodnoty P_{ow} závisia od podmienok prostredia, akými sú teplota, pH, iónová sila atď., a tie by sa mali v rámci pokusu definovať, aby bolo možné dosiahnuť správny výklad údajov P_{ow}. Pre ionizovateľné látky môže byť vhodná iná metóda [napr. návrh usmernení OECD o pH-metrickej metóde pre ionizované látky (6)], ktorá by sa mohla použiť ako alternatívna metóda. Hoci tento návrh usmernení OECD môže byť dostatočne vhodný na stanovenie P_{ow} pre spomínané ionizovateľné látky, v niektorých prípadoch je vhodnejšie použiť metódu HPLC pri environmentálne relevantných hodnotách pH (pozri bod 9).

([1]) Vrchná hranica je daná potrebou dosiahnuť fázu úplného oddelenia po úpravách rozdeľovacej rovnováhy a predtým, než sa odoberú vzorky na analytické stanovenie. Ak sa táto skutočnosť nezanedbá, vrchná hranica sa môže posunúť na vyššie hodnoty P_{ow}.

▼M6

PRINCÍP METÓDY

6. Metóda HPLC s reverznou fázou sa uskutočňuje na analytických kolónach naplnených komerčne dostupnou tuhou fázou obsahujúcou dlhé uhľovodíkové reťazce (napr. C8, C18), ktoré sú chemicky viazané na kremík.

7. Chemikália injektovaná na takúto kolónu sa rozdeľuje medzi pohyblivú rozpustnú fázu a uhľovodíkovú nepohyblivú fázu, keďže sa v kolóne transportuje pomocou pohyblivej fázy. Látky sa zadržiavajú proporcionálne k ich rozdeľovacej konštante medzi uhľovodíkom a vodou, pričom najskôr dochádza k elúcii hydrofilných a najneskôr lipofilných látok. Retenčný čas sa vyjadruje pomocou kapacitného faktora k, ktorý je daný vzorcom:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

kde t_R je retenčný čas testovanej látky a t_0 je mŕtvy čas, t. j. priemerný čas, ktorý molekula rozpúšťadla potrebuje na to, aby prešla kolónou. Kvantitatívne analytické metódy sa nepožadujú a potrebné je iba stanovenie retenčných časov.

8. Rozdeľovacia konštanta oktanol/voda testovanej látky sa môže vypočítať experimentálnym stanovením jej kapacitného faktora k a dosadením hodnoty k do tejto rovnice:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

kde

a, b sú koeficienty lineárnej regresie.

Uvedenú rovnicu je možné dosiahnuť lineárnou regresiou hodnôt dekadického logaritmu rozdeľovacích konštánt oktanol/voda referenčných látok voči hodnotám dekadického logaritmu kapacitných faktorov referenčných látok.

9. Metóda HPLC s reverznou fázou umožňuje odhad rozdeľovacích konštánt v rozsahu hodnôt log P_{ow} od 0 do 6, ale vo výnimočných prípadoch sa tento rozsah môže rozšíriť aj na hodnoty log P_{ow} od 6 do 10. To si môže vyžadovať úpravu pohyblivej fázy (3). Metódu nie je možné použiť v prípade silných kyselín a zásad, polymetalických látok, látok, ktoré reagujú s eluentom, alebo povrchovo aktívnych látok. Merania na ionizovateľných látkach v ich neionizovanej forme (voľná kyselina alebo voľná zásada) sa môžu vykonať len s použitím vhodného tlmivého roztoku s hodnotou pH nižšou ako pK_a pre voľnú kyselinu alebo vyššou ako pK_a pre voľnú zásadu. Ak je dostupná, môže sa ako alternatíva (6) použiť pH-metrická metóda na testovanie ionizovateľných látok (6). Ak sa hodnota log P_{ow} stanovuje na účely klasifikácie nebezpečnosti pre životné prostredie alebo posudzovania environmentálneho rizika, test by sa mal vykonať v rozsahu hodnôt pH relevantnom pre prírodné prostredie, t. j. pre hodnoty pH v rozsahu od 5,0 do 9.

10. V niektorých prípadoch môžu prímesi skomplikovať interpretáciu výsledkov v dôsledku neistoty vrcholovej špecifikácie. V prípade zmesí, ktoré vykazujú nerozpustené pásmo, je potrebné uviesť horné a dolné hraničné hodnoty log P_{ow}, ako aj percentuálny podiel plochy každého píku log P_{ow}. V prípade zmesí, ktoré predstavujú skupinu homológov, by sa mala uviesť aj vážená priemerná hodnota log P_{ow} (7), vypočítaná na základe jednotlivých hodnôt P_{ow} a zodpovedajúcich percentuálnych podielov plochy (8). Pri výpočte by sa mali vziať do úvahy všetky píky, ktorých podiel na celkovej ploche píku dosahuje hodnotu 5 % alebo viac (9):

▼**M6**

$$\textit{vážený priemer} \log P_{ow} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\textit{plocha \%})}{\textit{celková plocha píku \%}} = \frac{\sum (\textit{log } P_{owi})(\textit{plocha \%}_i)}{\sum_i \textit{plocha \%}}$$

Vážená priemerná hodnota log P_{ow} je platná len pre látky alebo zmesi (napr. talové oleje) pozostávajúce z homológov (napr. série alkánov). V prípade zmesí sa môžu dosiahnuť zmysluplné výsledky merania za predpokladu, že použitý analytický detektor má rovnakú citlivosť na všetky látky v zmesi a tie je možné primerane rozlíšiť.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

11. Pred použitím danej metódy by mala byť známa disociačná konštanta, štruktúrny vzorec a rozpustnosť v pohyblivej fáze. Užitočné môžu byť aj informácie o hydrolýze.

KRITÉRIÁ KVALITY

12. S cieľom zvýšiť dôveryhodnosť merania sa hodnoty musia stanoviť dvakrát.

— Opakovateľnosť: hodnoty log P_{ow} získané z opakovaných meraní vykonaných za rovnakých podmienok a s použitím rovnakého súboru referenčných látok by mali byť v rozsahu ± 0,1 log jednotiek.

— Reprodukovateľnosť: ak sa merania zopakujú s iným súborom referenčných látok, výsledky sa môžu líšiť. Korelačný koeficient R pre vzťah medzi log k a log P_{ow} pre súbor testovaných látok dosahuje spravidla hodnotu približne 0,9, čo zodpovedá rozdeľovacej konštante oktanol/voda log P_{ow} ± 0,5 log jednotiek.

13. Medzilaboratórny porovnávací test ukázal, že pomocou metódy HPLC je možné získať hodnoty log P_{ow} v rozsahu ± 0,5 jednotiek z hodnôt získaných pomocou metódy trepačkovej banky (2). Ďalšie porovnania je možné nájsť v literatúre pod číslami (4) (5) (10) (11) (12). Najpresnejšie výsledky poskytujú korelačné krivky založené na štrukturálne príbuzných referenčných látkach (13).

REFERENČNÉ LÁTKY

14. Na účely korelácie nameranej hodnoty kapacitného faktora k látky s jej hodnotou P_{ow} je potrebné vytvoriť kalibračnú krivku pomocou najmenej šiestich bodov (pozri bod 24). Je na používateľovi, aby si zvolil vhodné referenčné látky. Hodnota log P_{ow} testovanej látky by mala byť spravidla v rozsahu hodnôt log P_{ow} referenčných látok, t. j. najmenej jedna referenčná látka by mala mať hodnotu P_{ow} vyššiu než testovaná látka a iná zasa hodnotu P_{ow} nižšiu než testovaná látka. Extrapolácia by sa mala použiť iba vo výnimočných prípadoch. Uprednostňovať by sa mali referenčné látky, ktoré sú štrukturálne príbuzné s testovanou látkou. Hodnoty log P_{ow} referenčných látok, ktoré sa používajú na kalibráciu, by mali byť založené na spoľahlivých experimentálnych údajoch. V prípade látok s vysokou hodnotou log P_{ow} (obyčajne viac ako 4) sa môžu používať vypočítané hodnoty, ak nie sú k dispozícii spoľahlivé experimentálne údaje. Ak sa použijú extrapolované hodnoty, je potrebné uviesť hraničnú hodnotu.

15. Pre mnohé skupiny chemikálií existujú rozsiahle zoznamy hodnôt log P_{ow} (14) (15). Ak údaje týkajúce sa rozdeľovacích konštánt štrukturálne príbuzných látok nie sú dostupné, je možné použiť všeobecnejšiu kalibráciu vykonanú s inými referenčnými látkami. Odporúčané referenčné látky a ich hodnoty P_{ow} sú uvedené v tabuľke 1. V prípade ionizovateľných látok platia dané hodnoty pre ich neionizovanú formu. Hodnovernosť a kvalita uvedených údajov boli skontrolované v rámci medzilaboratórneho porovnávacieho testu.

▼**M6**

Tabuľka 1

Odporúčané referenčné látky

	Číslo CAS	Referenčná látka	log P_{ow}	pKa
1	78-93-3	2-butanón (metyletylketón)	0,3	
2	1122-54-9	4-acetylpyridín	0,5	
3	62-53-3	anilín	0,9	
4	103-84-4	acetanilid	1,0	
5	100-51-6	benzylakohol	1,1	
6	150-76-5	4-metoxyfenol	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	kyselina fenoxyoctová	1,4	pKa = 3,12
8	108-95-2	fenol	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	benzonitril	1,6	
11	140-29-4	fenylacetonitril	1,6	
12	589-18-4	4-metylbenzylalkohol	1,6	
13	98-86-2	acetofenón	1,7	
14	88-75-5	2-nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	kyselina 3-nitrobenzoová	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-chlóranilín	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	nitrobenzén	1,9	
18	104-54-1	(*E*)-fenylprop-2-én-1-ol (škoricový alkohol)	1,9	
19	65-85-0	kyselina benzoová	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	*p*-krezol	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (*trans*)	kyselina škoricová	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	anizol	2,1	
23	93-58-3	metylbenzoát	2,1	
24	71-43-2	benzén	2,1	
25	99-04-7	kyselina 3-metylbenzoová	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-chlórfenol	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	trichlóretylén	2,4	
28	1912-24-9	atrazín	2,6	
29	93-89-0	etyl-benzoát	2,6	

▼**M6**

	Číslo CAS	Referenčná látka	log P_{ow}	pKa
30	1194-65-6	2,6-dichlórbenzonitril	2,6	
31	535-80-8	kyselina 3-chlórbenzoová	2,7	pKa = 3,82
32	108-88-3	toluén	2,7	
33	90-15-3	1-naftol	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-dichlóranilín	2,8	
35	108-90-7	chlórbenzén	2,8	
36	1746-13-0	alyl(fenyl)éter	2,9	
37	108-86-1	brómbenzén	3,0	
38	100-41-4	etylbenzén	3,2	
39	119-61-9	benzofenón	3,2	
40	92-69-3	4-fenylfenol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	tymol	3,3	
42	106-46-7	1,4-dichlórbenzén	3,4	
43	122-39-4	difenylamín	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	naftalén	3,6	
45	93-99-2	fenyl-benzoát	3,6	
46	98-82-8	izopropylbenzén	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-trichlórfenol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	bifenyl	4,0	
49	120-51-4	benzyl-benzoát	4,0	
50	88-85-7	2,4-dinitro-6-*sek*-butylfenol	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-trichlórbenzén	4,2	
52	143-07-7	kyselina dodekánová	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	(difenyl)éter	4,2	
54	85-01-8	fenantrén	4,5	
55	104-51-8	*n*-butylbenzén	4,6	
56	103-29-7	dibenzyl	4,8	
57	3558-69-8	2,6-difenylpyridín	4,9	
58	206-44-0	fluorantén	5,1	
59	603-34-9	trifenylamín	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

▼M6

OPIS METÓDY

Predbežný odhad rozdeľovacej konštanty

16. Uprednostňuje sa odhad rozdeľovacej konštanty použitím výpočtovej metódy (pozri dodatok), alebo kde je to vhodné, na základe pomeru rozpustností testovanej látky v čistých rozpúšťadlách.

Zariadenie

17. Požaduje sa kvapalinový chromatograf vybavený nízkoimpulzným čerpadlom a vhodným detekčným systémom. Na širokú škálu chemických skupín je možné uplatniť UV detektor, ktorý využíva vlnovú dĺžku 210 nm, alebo refraktometrický (RI) detektor. Prítomnosť polárnych skupín v nepohyblivej fáze môže vážne narušiť fungovanie kolóny vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC). Preto by mali nepohyblivé fázy obsahovať minimálny podiel polárnych skupín (16). Je možné použiť aj komerčné mikročasticové náplne s reverznou fázou alebo kolóny s hotovou náplňou. Medzi vstrekovací systém a analytickú kolónu sa môže umiestniť ochranná kolóna.

Pohyblivá fáza

18. Na prípravu eluačného rozpúšťadla, ktoré treba pred použitím odplyniť, sa používa metanol kvalitatívnej triedy HPLC a destilovaná alebo deionizovaná voda. Mala by sa použiť izokratická elúcia. Použiť treba pomery metanolu a vody s minimálnym obsahom vody 25 %. Na elúciu látok s hodnotou log P rovnajúcou sa hodnote 6 v priebehu jednej hodiny pri prietoku 1 ml za minútu spravidla postačí pomer zmesi metanolu a vody 3:1 (objemový zlomok). Pre látky s hodnotou log P vyššou ako 6 môže byť potrebné skrátiť čas elúcie (ako aj časy referenčných látok) znížením polarity pohyblivej fázy alebo skrátením dĺžky kolóny.

19. Testovaná látka a referenčné látky musia byť rozpustné v pohyblivej fáze v dostatočných koncentráciách, aby sa umožnila ich detekcia. Iba vo výnimočných prípadoch sa môžu so zmesou metanolu a vody použiť aj aditíva, keďže menia vlastnosti kolóny. V týchto prípadoch musí byť potvrdené, že retenčné časy testovanej látky a referenčných látok nie sú ovplyvnené. Ak zmes metanolu a vody nie je vhodná, môžu sa použiť iné zmesi organického rozpúšťadla a vody, napríklad zmes etanolu a vody, acetonitrilu a vody alebo izopropylalkoholu (2-propanolu) a vody.

20. Hodnota pH eluentu je kritická pre ionizovateľné látky. Táto hodnota by mala byť v prevádzkovom rozsahu pH kolóny, ktorý je spravidla od 2 do 8. Odporúča sa pufrovanie. Treba dbať na to, aby sa zabránilo zrážaniu solí a poškodeniu kolóny, ku ktorým dochádza v prípade použitia niektorých organických zmesí fázy a pufra. Merania metódou HPLC s nepohyblivými fázami na báze kremíka s hodnotami pH nad 8 sa spravidla neodporúčajú, lebo použitie alkalickej pohyblivej fázy môže zapríčiniť rýchle poškodenie funkčnosti kolóny.

Rozpustené látky

21. Testované a referenčné látky musia byť dostatočne čisté, aby bolo možné priradiť jednotlivé píky v chromatogramoch príslušným látkam. Ak je to možné, mali by byť látky určené na použitie v rámci testu alebo kalibrácie rozpustené v pohyblivej fáze. Ak sa na rozpustenie testovaných a referenčných látok používa iné rozpúšťadlo ako mobilná fáza, mala by sa mobilná fáza použiť na konečné zriedenie pred vstreknutím.

Podmienky testu

22. Teplota počas merania by sa nemala meniť o viac ako ± 1 °C.

▼M6

Stanovenie mŕtveho času t_0

23. Mŕtvy čas t_0 sa môže merať použitím nezadržaných organických látok (napr. tiomočoviny alebo formamidu). Presnejšie je možné mŕtvy čas odvodiť z nameraných retenčných časov alebo zo súboru približne siedmich členov homologického radu (napr. *n*-alkylmetylových ketónov) (17) Retenčné časy t_R (n_C + 1) sú graficky znázornené v diagrame ako funkcia t_R (n_C), kde n_C je počet atómov uhlíka. Vznikne priamka t_R (n_C + 1) = A t_R (n_C) + (1 – A)t_0, kde hodnota A, ktorá predstavuje vzorec k (n_C + 1)/k (n_C), je konštantná. Mŕtvy čas t_0 sa získa z úseku priamky (1 – A)t_0 a sklonu A.

Regresná rovnica

24. Ďalším krokom postupu je zostrojenie korelačného diagramu hodnôt log k v závislosti od hodnôt log P pre vhodné referenčné látky s hodnotami log P blízkymi očakávanej hodnote log P testovanej látky. V praxi sa súčasne vstrekne 6 až 10 referenčných látok. Stanoví sa retenčný čas, podľa možnosti na záznamovej integračnej jednotke napojenej na detekčný systém. Zodpovedajúce logaritmy kapacitných faktorov log k sa nanesú do diagramu ako funkcia log P. Regresný výpočet sa vykonáva v pravidelných časových intervaloch, najmenej raz denne, aby sa tak dali vziať do úvahy možné zmeny v činnosti kolóny.

STANOVENIE P_{OW} TESTOVANEJ LÁTKY

25. Testovaná látka sa vstrekuje v najmenších zistiteľných množstvách. Retenčný čas sa stanovuje dvakrát. Rozdeľovacia konštanta testovanej látky sa získa interpoláciou vypočítaného kapacitného faktora na kalibračnej krivke. Pre veľmi nízke a veľmi vysoké rozdeľovacie konštanty je potrebná extrapolácia. Najmä v týchto prípadoch sa musí venovať pozornosť hraniciam spoľahlivosti regresnej priamky. Ak je retenčný čas vzorky mimo rozsahu retenčných časov zistených pre normy, mala by sa uviesť hraničná hodnota.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Protokol o skúške

26. Protokol musí obsahovať tieto údaje:

— odhadnuté hodnoty rozdeľovacej konštanty a použitú metódu, ak sa stanoví predbežný odhad rozdeľovacej konštanty a úplný opis metódy vrátane identifikácie databázy a podrobných informácií o výbere fragmentov, ak sa použije výpočtová metóda,

— testované a referenčné látky: čistotu, štrukturálny vzorec a číslo CAS,

— opis zariadenia a prevádzkových podmienok: analytická kolóna, ochranná kolóna (predkolóna),

— pohyblivú fázu, spôsob detekcie, rozsah teplôt, pH,

— elučné profily (chromatogramy),

— mŕtvy čas a spôsob, akým sa meral,

— retenčné údaje a hodnoty log P_{ow} z odbornej literatúry pre referenčné látky použité v rámci kalibrácie,

— podrobnosti o zodpovedajúcej regresnej priamke (hodnoty log k v závislosti od hodnôt log P_{ow}) a korelačný koeficient priamky vrátane intervalov spoľahlivosti,

▼**M6**

— priemerné retenčné údaje a interpolovanú hodnotu log P_{ow} pre testovanú látku,

— v prípade zmesi: chromatogram elučného profilu s uvedenými hraničnými hodnotami,

— hodnoty log P_{ow} vzťahujúce sa na percentuálny podiel plochy píku log P_{ow},

— výpočet pomocou regresnej priamky,

— v prípade potreby vypočítané vážené priemerné hodnoty log P_{ow}.

LITERATÚRA

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

Dodatok

Metódy výpočtu P_{OW}

ÚVOD

1. Tento dodatok obsahuje krátky úvod k výpočtu P_{ow}. Ďalšie informácie sú k dispozícii v príručkách uvedených v literatúre pod číslami (1) (2).

2. Vypočítané hodnoty P_{ow} sa používajú pri:

— rozhodovaní o tom, ktorú experimentálnu metódu použiť: buď metódu trepačkovej banky pre hodnoty log P_{ow} v rozsahu od – 2 do 4, alebo metódu HPLC pre hodnoty log P_{ow} v rozsahu od 0 do 6,

— výbere podmienok použitia metódy HPLC (referenčné látky, pomer metanol/voda),

— kontrole hodnovernosti hodnôt získaných pomocou experimentálnych metód,

— stanovení odhadu, kedy sa nemôžu uplatniť experimentálne metódy.

Princíp výpočtových metód

3. Všetky výpočtové metódy sú založené na teoretickom trieštení molekuly na vhodné subštruktúry, pre ktoré sú známe spoľahlivé prírastky hodnoty log P_{ow}. Hodnota log P_{ow} sa potom vypočíta ako súčet jej čiastkových hodnôt a korekčných členov pre vnútromolekulové interakcie. Zoznamy fragmentových konštánt a korekčných členov sú k dispozícii v literatúre pod číslami (1) (2) (3) (4) (5) (6). Niektoré z nich sa pravidelne aktualizujú (3).

Spoľahlivosť vypočítaných hodnôt

4. Spoľahlivosť výpočtovej metódy vo všeobecnosti klesá s narastajúcou komplexnosťou skúmanej látky. V prípade jednoduchých molekúl s nízkou molekulovou hmotnosťou a jednej alebo dvoch funkčných skupín je možné predpokladať odchýlku 0,1 – 0,3 jednotiek log P_{ow} medzi výsledkami rozličných fragmentačných metód a nameranými hodnotami. Hranica chyby bude závisieť od spoľahlivosti použitých fragmentových konštánt, schopnosti rozoznať vnútromolekulové interakcie (napr. vodíkové väzby) a správneho použitia korekčných členov. V prípade ionizujúcich látok je potrebné zohľadniť náboj a stupeň ionizácie (10).

Fujitova-Hanschova πmetóda

5. Hydrofóbna substituenčná konštanta π, ktorú pôvodne zaviedol Fujita a kol. (7) ako:

$$^{\pi}X = \log P_{ow}\ (PhX) - \log P_{ow}\ (PhH)$$

kde PhX predstavuje aromatický derivát a PhH východiskovú látku.

$$\text{napr.}\quad ^{\pi}Cl = \log P_{ow}\ (C_{6H5}Cl) - \log P_{ow}\ (C_6H_6)$$
$$= 2{,}84 - 2{,}13$$
$$= 0{,}71$$

Metóda π (π-metóda) je použiteľná predovšetkým pre aromatické látky. K dispozícii sú hodnoty π pre veľký počet substituentov (4) (5).

Rekkerova metóda

6. Pomocou Rekkerovej metódy (8) sa hodnota log P_{ow} vypočíta takto:

$$Log\ P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{interakčné členy})$$

▼M6

kde a_i predstavuje počet prípadov výskytu daného fragmentu v molekule a fi prírastok hodnoty log P_{ow} fragmentu. Interakčné členy môžu byť vyjadrené ako integrálny (celý) násobok jednej jedinej konštanty C_m (tzv. „magickej konštanty“). Fragmentové konštanty f_i a C_m boli stanovené zo zoznamu 1 054 experimentálnych hodnôt P_{ow} 825 látok použitím zloženej regresnej analýzy (6) (8). Interakčné členy sa určujú podľa stanovených pravidiel (6) (8) (9).

Hanschova-Leova metóda

7. Pomocou Hanschovej a Leovej metódy (4) sa hodnota log P_{ow} vypočíta takto:

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

kde f_i predstavuje fragmentovú konštantu, F_j korekčný člen (faktor), a_i a b_j príslušné frekvencie výskytu. Zoznamy atómových a skupinových fragmentových hodnôt a korekčných členov F_j boli odvodené metódou pokusov a chýb z experimentálnych hodnôt P_{ow}. Korekčné členy boli rozdelené do niekoľkých rozdielnych tried (1) (4). Na zohľadnenie všetkých pravidiel a korekčných členov boli vypracované softvérové balíky (3).

KOMBINOVANÁ METÓDA

8. Výpočet hodnoty log P_{ow} komplexných molekúl je možné do značnej miery zdokonaliť, ak sa molekula rozdelí na väčšie subštruktúry, pre ktoré sú k dispozícii spoľahlivé hodnoty log P_{ow}, a to buď z tabuliek (3) (4), alebo z existujúcich meraní. Takéto fragmenty (napr. heterocykly, antrachinón, azobenzén) sa potom môžu kombinovať s Hanschovými hodnotami π, prípadne s Rekkerovými alebo Leovými fragmentovými konštantami.

Poznámky

i) Výpočtové metódy je možné použiť iba pre čiastočne alebo úplne ionizované látky, keď sa zohľadnia potrebné korekčné faktory.

ii) Ak je možné predpokladať existenciu vnútromolekulových vodíkových väzieb, je potrebné prirátať zodpovedajúce korekčné členy (približne + 0,6 až + 1,0 jednotiek log P_{ow}) (1). Indikácie týkajúce sa prítomnosti takýchto väzieb je možné získať zo stereomodelov alebo zo spektroskopických údajov.

iii) Ak sú možné viaceré tautomérne formy, za základ výpočtu by sa mala použiť najpravdepodobnejšia forma.

iv) Je potrebné pozorne sledovať všetky revízie zoznamov fragmentových konštánt.

LITERATÚRA K VÝPOČTOVÝM METÓDAM

1. W.J. Lyman, W.F. 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. **DISOCIAČNÉ KONŠTANTY VO VODE (TITRAČNÁ METÓDA – SPEKTROFOTOMETRICKÁ METÓDA – KONDUKTOMETRICKÁ METÓDA)**

ÚVOD

Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov 112 (1981).

Základné požiadavky

— Vhodná analytická metóda

— Rozpustnosť vo vode

Usmerňujúce informácie

— Štruktúrny vzorec

— Elektrická vodivosť na účely konduktometrickej metódy

Všeobecné informácie o metóde

— Všetky testovacie metódy možno vykonať s čistými látkami alebo látkami obchodnej akosti. Mali by sa zvážiť možné účinky nečistôt na výsledky.

— Titračná metóda nie je vhodná pre málo rozpustné látky (testované roztoky pozri ďalej).

— Spektrofotometrickú metódu možno použiť len na látky, ktorých disociované a nedisociované formy majú značne odlišné absorpčné spektrá v oblasti UV žiarenia/viditeľného svetla (VIS). Táto metóda môže byť vhodná aj pre málo rozpustné látky a látky, ktoré nedisociujú acidobázicky, napr. komplexy.

— V prípadoch, v ktorých platí Onsagerova rovnica, možno použiť konduktometrickú metódu dokonca aj pri stredne nízkych koncentráciách a dokonca aj v prípadoch, keď nejde o acidobazickú rovnováhu.

Štandardné dokumenty

Táto testovacia metóda je založená na metódach uvedených v odkazoch v oddiele „Literatúra“ a v publikácii Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification EPA, August 18, 1978.

METÓDA – ÚVOD, ÚČEL, ROZSAH, RELEVANTNOSŤ, POUŽITIE A OBMEDZENIA TESTU

Disociácia látky vo vode je dôležitá pri posudzovaní jej vplyvu na životné prostredie. Riadi formu látky, ktorá zas určuje jej správanie a prenos. Môže ovplyvniť adsorpciu chemikálií na pôdach a sedimentoch a absorpciu do biologických buniek.

Definície a jednotky

Disociácia je reverzibilné štiepenie na dve alebo viaceré chemické podoby, ktoré môžu byť iónmi. Tento proces sa vo všeobecnosti vyjadruje ako

$$RX \rightleftharpoons R^{+} + X^{-}$$

a konštanta definovaná rovnovážnymi koncentráciami (rovnovážna konštanta), ktorou sa reakcia riadi je

$$K = \frac{[R^{+}][X^{-}]}{[RX]}$$

Napríklad v konkrétnom prípade, kde R je vodík (látka je kyselina), konštanta je

▼M7

$$K_\alpha = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

alebo

$$pK_\alpha = pH - \log\frac{[X^-]}{[HX]}$$

Referenčné látky

Tieto referenčné látky sa nemusia použiť vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová látka. Uvádzajú sa predovšetkým preto, aby sa z času na čas mohla vykonať kalibrácia metódy a aby sa umožnilo porovnanie výsledkov, ak sa použije iná metóda.

	pK_a ([1])	Tepl. v °C
p-nitrofenol	7,15	25 ([1])
Kyselina benzoová	4,12	20
p-chlóranilín	3,93	20

([1]) Žiadna hodnota pri 20 °C nie je k dispozícii, ale možno predpokladať, že variabilita výsledkov merania je vyššia než teplotná závislosť, ktorú možno očakávať.

Bolo by užitočné mať látku s niekoľkými pK, ako sa uvádza v princípe metódy uvedenom ďalej. Takýmito látkami by mohli byť:

Kyselina citrónová	pK_a (8)	Tepl. v °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Princíp testovacej metódy

Chemický proces opísaný vo všeobecnosti len mierne závisí od teploty v teplotnom rozsahu relevantnom pre dané prostredie. Určenie disociačnej konštanty si vyžaduje meranie koncentrácií disociovaných a nedisociovaných foriem chemickej látky. So znalosťou stechiometrie disociačnej reakcie uvedenej v časti Definície a jednotky možno určiť príslušnú konštantu. V tomto konkrétnom prípade opísanom v tejto testovacej metóde sa látky správajú ako kyseliny alebo zásady a ich stanovenie možno najľahšie uskutočniť stanovením relatívnej koncentrácie ionizovanej a neionizovanej formy látky a pH roztoku. Vzťah medzi uvedenými pojmami je daný rovnicou pre pK_a v časti Definície a jednotky. Niektoré látky vykazujú viac ako jednu disociačnú konštantu. V takom prípade možno rozvinúť podobné rovnice. Niektoré z metód uvedených v tomto dokumente sú vhodné aj pri iných ako acidobázických disociáciách.

Kritériá kvality

Opakovateľnosť

Disociačná konštanta by sa mala dať zopakovať (pri minimálne troch stanoveniach) s presnosťou na ± 0,1 log jednotiek.

OPIS TESTOVACEJ METÓDY

K stanoveniu pK_a existujú dva základné prístupy. V rámci jedného sa známe množstvo látky titruje podľa potreby kyselinou alebo zásadou, druhý zahŕňa určenie relatívnej koncentrácie ionizovanej a neionizovanej formy látky a jej závislosti od pH.

▼M7

Príprava

Metódy založené na uvedených zásadách možno rozdeliť na titráciu, spektrofotometriu a konduktometriu.

Testovacie roztoky

Pri titračnej a konduktometrickej metóde by sa chemická látka mala rozpustiť v destilovanej vode. Pri spektrofotometrickej alebo inej metóde sa použijú tlmivé roztoky. Koncentrácia testovanej látky by nemala presiahnuť 0,01 M alebo polovicu koncentrácie látky v nasýtenom roztoku, podľa toho, ktorá z uvedených koncentrácií je nižšia, pričom by sa na prípravu roztokov mala použiť najčistejšia dostupná forma látky. Ak je látka len čiastočne rozpustná, možno ju pred prípravou roztokov s uvedenými koncentráciami rozpustiť v malom množstve vodou miešateľného rozpúšťadla.

Roztoky by sa mali skontrolovať na prítomnosť emulzií s využitím Tyndallovho javu, najmä ak bol na zvýšenie rozpustnosti použitý kosolvent. Ak sa použijú tlmivé roztoky, ich koncentrácia by nemala presiahnuť 0,05 M.

Podmienky testu

Teplota

Teplota by sa mala udržiavať s presnosťou najmenej ± 1 °C. Stanovenie by sa podľa možnosti malo uskutočniť pri 20 °C.

Ak existuje podozrenie, že látka je významne závislá od teploty, stanovenie by sa malo vykonať aspoň pri dvoch ďalších teplotách. V takom prípade by intervaly medzi teplotami mali byť 10 °C a teplota by sa mala udržiavať v rozmedzí ± 0,1 °C.

Analýzy

Konkrétna analytická metóda sa určí na základe charakteristických vlastností testovanej látky. Musí byť dostatočne citlivá, aby ňou bolo možné stanoviť rôzne druhy chemikálií pri každej koncentrácii testovaného roztoku.

Vykonanie testu

Titračná metóda

Testovaný roztok sa stanovuje titráciou štandardným roztokom kyseliny alebo zásady (podľa vhodnosti), pričom po každom pridaní titračného činidla sa odmeria pH. Pred dosiahnutím bodu ekvivalencie by sa malo pridať aspoň 10 čiastkových množstiev. Ak sa rovnováha dosiahne dostatočne rýchlo, možno použiť potenciometer so zapisovaním. Pri tejto metóde musí byť presne známe celkové množstvo látky a jej koncentrácia. Musia sa prijať preventívne opatrenia na vylúčenie oxidu uhličitého. Podrobnosti postupu, preventívnych opatrení a výpočtu sú uvedené v štandardných testoch, napr. odkazy (1), (2), (3), (4).

Spektrofotometrická metóda

Zistí sa vlnová dĺžka, pri ktorej má ionizovaná a neionizovaná forma látky výrazne odlišné mólové absorpčné (extinkčné) koeficienty. Absorpčné spektrum UV/VIS sa získa z roztokov konštantnej koncentrácie pri pH, pri ktorom je príslušná látka v podstate neionizovaná, pri ktorom je plne ionizovaná a pri niekoľkých pH nachádzajúcich sa medzi nimi. Dosiahnuť to možno buď pridaním koncentrovanej kyseliny (zásady) k pomerne veľkému objemu roztoku látky vo viaczložkovom tlmivom roztoku, a to spočiatku pri vysokom (nízkom) pH (odkaz 5), alebo pridaním rovnakých objemov zásobného roztoku látky, napr. vo vode, v metanole, do konštantných objemov rôznych tlmivých roztokov pokrývajúcich požadovaný rozsah pH. Z hodnôt pH a absorbancie pri zvolenej vlnovej dĺžke sa vypočíta dostatočný počet hodnôt pK_a, pričom sa použije aspoň 5 hodnôt pH, pri ktorých je látka ionizovaná najmenej na 10 percent a zároveň menej ako na 90 percent. Ďalšie podrobnosti experimentu a metóda výpočtu sú uvedené v odkaze (1).

▼M7

Konduktometrická metóda

Odmeria sa vodivosť približne 0,1 M elektricky vodivého vodného roztoku látky, pričom sa použije vodivostný článok so známou malou konštantou vodivostného článku. Odmeria sa aj vodivosť niekoľkých presných zriedení daného roztoku. Koncentrácia sa pri každom riedení zníži na polovicu, pričom celá séria by mala pokrývať aspoň koncentrácie v rozmedzí jedného rádu. Medzná (limitná) vodivosť pri nekonečnom riedení sa zistí vykonaním podobného experimentu so sodíkovou soľou a následnou extrapoláciou. Stupeň disociácie možno potom vypočítať z vodivosti každého roztoku pomocou Onsagerovej rovnice, a teda pomocou Ostwaldovho zrieďovacieho zákona možno disociačnú konštantu vypočítať ako $K = \alpha^2C/(1 - \alpha)$, kde C je koncentrácia v mol/l a α je (disociačný stupeň) disociovaná frakcia. Musia sa prijať preventívne opatrenia na vylúčenie CO_2. Ďalšie podrobnosti experimentu a metóda výpočtu sú uvedené v štandardných textoch a v odkazoch (1), (6) a (7).

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Spracovanie výsledkov

Titračná metóda

Hodnota pK_a sa vypočíta z 10 nameraných bodov na titračnej krivke. Vypočíta sa priemer a štandardná odchýlka týchto hodnôt pK_a. Spolu s tabuľkou výsledkov by sa mal predložiť aj graf závislosti pH od objemu štandardnej zásady alebo kyseliny.

Spektrofotometrické metódy

Z hodnôt absorbancie a pH z každého spektra sa zostaví tabuľka. Z medziľahlých údajov spektier sa vypočíta aspoň päť hodnôt pK_a a takisto priemer a štandardná odchýlka týchto výsledkov.

Konduktometrická metóda

Pre každú koncentráciu kyseliny a pre každú koncentráciu zmesi jedného ekvivalentu kyseliny a 0,98 ekvivalentu bezuhličitanového hydroxidu sodného sa vypočíta ekvivalent vodivosti Λ. Kyselina má byť v prebytku, aby sa predišlo prebytku OH^- iónov v dôsledku hydrolýzy. Hodnoty $1/\Lambda$ sa zobrazia v grafe v závislosti od $\sqrt{C}$ a Λ_o soli možno zistiť extrapoláciou pri nulovej koncentrácii.

Hodnotu Λ_o kyseliny možno vypočítať z hodnôt pre H^+ a Na^+ uvádzaných v literatúre. Hodnotu pK_a možno vypočítať zo vzorca $\alpha = \Lambda_i/\Lambda_o$ a $K_a = \alpha^2C/(1 - \alpha)$ pre každú koncentráciu. Presnejšie hodnoty K_a možno získať vykonaním korekcií na mobilitu a aktivitu. Mal by sa vypočítať priemer a štandardná odchýlka hodnôt pK_a.

Skúšobný protokol

Predložiť by sa mali všetky nespracované údaje a vypočítané hodnoty pK_a spolu s metódou výpočtu (najlepšie v tabuľkovej forme, napr. podľa návrhu v odkaze 1), ako aj štatistické parametre opísané v predchádzajúcej časti. V prípade titračných metód by sa mali uviesť podrobnosti o štandardizácii štandardných roztokov.

V prípade spektrofotometrickej metódy by sa mali uviesť všetky spektrá. V prípade konduktometrickej metódy by sa mali uviesť podrobnosti o stanovení konštanty vodivostného článku. Mali by sa uviesť informácie o použitej technike, analytických metódach a povahe všetkých použitých tlmivých roztokov.

Mala by sa uviesť skúšobná teplota(-y).

LITERATÚRA

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 (pozri vyššie 4).

8. *Handbook of Chemistry and Physics*, 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).

▼B

ČASŤ B: METÓDY NA STANOVENIE TOXIKOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ A INÉHO ÚČINKU NA ZDRAVIE

OBSAH

VŠEOBECNÝ ÚVOD

B.1a. AKÚTNA ORÁLNA TOXICITA – METÓDA STABILNEJ DÁVKY

B.1b. AKÚTNA ORÁLNA TOXICITA – METÓDA TRIEDY AKÚTNEJ TOXICITY

B.2. AKÚTNA INHALAČNÁ TOXICITA

B.3. AKÚTNA TOXICITA (DERMÁLNA)

B.4. AKÚTNE PODRÁŽDENIE/POLEPTANIE KOŽE

B.5. AKÚTNE PODRÁŽDENIE/POLEPTANIE OKA

B.6. PODRÁŽDENIE POKOŽKY

B.7. 28-DŇOVÁ ŠTÚDIA ORÁLNEJ TOXICITY PRI HLODAVCOCH/TEST V OPAKOVANÝCH DÁVKACH

B.8. SUBAKÚTNA INHALAČNÁ TOXICITA: 28-DŇOVÁ ŠTÚDIA

B.9. TOXICITA PO 28-DŇOVEJ OPAKOVANEJ DÁVKE (DERMÁLNA)

B.10. TEST *IN VITRO* NA CHROMOZÓMOVÉ ABERÁCIE U CICAVCOV

B.11. TEST NA CHROMOZÓMOVÉ ABERÁCIE V CICAVČÍCH BUNKÁCH KOSTNEJ DRENE

B.12. MIKROJADROVÝ (MIKRONUKLEOVÝ) TEST NA ERYTROCYTOCH CICAVCOV

B.13/14. MUTAGÉNNOSŤ: BAKTERIÁLNY TEST REVERZNÝCH MUTÁCIÍ

B.17. *IN VITRO* TESTY NA GÉNOVÉ MUTÁCIE CICAVČÍCH BUNIEK S VYUŽITÍM GÉNOV HPRT A XPRT

B.21. TESTY BUNKOVEJ TRANSFORMÁCIE CICAVČÍCH BUNIEK *IN VITRO*

B.22. TEST DOMINANTNÝCH LETÁLNYCH MUTÁCIÍ PRI HLODAVCOCH

▼B

B.23.	TEST SPERMATOGONIÁLNEJ CHROMOZÓMOVEJ ABERÁCIE U CICAVCOV
B.25.	DEDIČNÁ TRANSLOKÁCIA U MYŠÍ
B.26.	TEST SUBCHRONICKEJ ORÁLNEJ TOXICITY: OPAKOVANÁ 90-DŇOVÁ ŠTÚDIA ORÁLNEJ TOXICITY U HLODAVCOV/TEST V OPAKOVANÝCH DÁVKACH/
B.27.	TEST SUBCHRONICKEJ ORÁLNEJ TOXICITY: OPAKOVANÁ 90-DŇOVÁ ŠTÚDIA ORÁLNEJ TOXICITY U NEHLODAVCOV
B.28.	ŠTÚDIA SUBCHRONICKEJ DERMÁLNEJ TOXICITY PO 90-DŇOVEJ OPAKOVANEJ KOŽNEJ APLIKÁCII U HLODAVCOV
B.29.	SUBCHRONICKÁ INHALAČNÁ TOXICITA: 90-DŇOVÁ ŠTÚDIA
B.30.	ŠTÚDIE CHRONICKEJ TOXICITY
B.31.	ŠTÚDIA PRENATÁLNEJ VÝVOJOVEJ TOXICITY
B.32.	ŠTÚDIE KARCINOGENITY
B.33.	KOMBINOVANÁ ŠTÚDIA CHRONICKEJ TOXICITY/KARCINOGENITY
B.34.	JEDNOGENERAČNÝ REPRODUKČNÝ TEST TOXICITY
B.35.	DVOJGENERAČNÁ ŠTÚDIA REPRODUKČNEJ TOXICITY
B.36.	TOXIKOKINETIKA
B.37.	ONESKORENÁ NEUROTOXICITA ORGANOFOSFOROVÝCH LÁTOK PO AKÚTNEJ EXPOZÍCII ICH ÚČINKOM
B.38.	ONESKORENÁ NEUROTOXICITA ORGANOFOSFOROVÝCH LÁTOK PRI 28-DŇOVEJ ŠTÚDII OPAKOVANEJ DÁVKY
B.39.	TEST NEPLÁNOVANEJ SYNTÉZY DNA (UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS – UDS) S PEČEŇOVÝMI BUNKAMI CICAVCOV *IN VIVO*
B.40.	POLEPTANIE KOŽE *IN VITRO*: TESTOVACIA METÓDA POMOCOU TRANSKUTÁNNEHO ELEKTRICKÉHO ODPORU (TER)
B.40a.	POLEPTANIE KOŽE *IN VITRO*: TESTOVACIA METÓDA S POUŽITÍM REKONŠTRUOVANEJ ĽUDSKEJ POKOŽKY (RhE)
B.41.	TEST FOTOTOXICITY 3T3 NRU *IN VITRO*
B.42.	SENZIBILIZÁCIA KOŽE: LOKÁLNA SKÚŠKA LYMFATICKÝCH UZLÍN

▼B

B.43. ŠTÚDIA NEUROTOXICITY U HLODAVCOV

B.44. ABSORPCIA KOŽOU: METÓDA *IN VIVO*

B.45. ABSORPCIA KOŽOU: METÓDA *IN VITRO*

B.46. PODRÁŽDENIE KOŽE *IN VITRO*: TEST NA MODELI REKONŠTRUOVANEJ ĽUDSKEJ POKOŽKY

B.47. TESTOVACIA METÓDA ZÁKALU A PRIEPUSTNOSTI HOVÄDZEJ ROHOVKY NA IDENTIFIKÁCIU I) CHEMIKÁLIÍ VYVOLÁVAJÚCICH VÁŽNE POŠKODENIE OČÍ A II) CHEMIKÁLIÍ, KTORÉ SI NEVYŽADUJÚ KLASIFIKÁCIU AKO CHEMIKÁLIE SPÔSOBUJÚCE PODRÁŽDENIE OČÍ ALEBO VÁŽNE POŠKODENIE OČÍ

B.48. TESTOVACIA METÓDA IZOLOVANÉHO KURACIEHO OKA NA IDENTIFIKÁCIU I) CHEMIKÁLIÍ VYVOLÁVAJÚCICH VÁŽNE POŠKODENIE OČÍ A II) CHEMIKÁLIÍ, KTORÉ SI NEVYŽADUJÚ KLASIFIKÁCIU AKO CHEMIKÁLIE SPÔSOBUJÚCE PODRÁŽDENIE OČÍ ALEBO VÁŽNE POŠKODENIE OČÍ

B.49. MIKROJADROVÝ (MIKRONUKLEOVÝ) TEST NA CICAVČÍCH BUNKÁCH *IN VITRO*

B.50. SENZIBILIZÁCIA KOŽE: LOKÁLNA SKÚŠKA LYMFATICKÝCH UZLÍN: DA

B.51. SENZIBILIZÁCIA KOŽE: LOKÁLNA SKÚŠKA LYMFATICKÝCH UZLÍN: BRDU-ELISA

B.52. AKÚTNA INHALAČNÁ TOXICITA – METÓDA AKÚTNEJ TOXICKEJ TRIEDY

B.53. ŠTÚDIA VÝVOJOVEJ NEUROTOXICITY

B.54. UTEROTROFICKÝ BIOLOGICKÝ TEST U HLODAVCOV: KRÁTKODOBÝ SKRÍNINGOVÝ TEST NA ESTROGÉNNE VLASTNOSTI

B.55. HERSHBERGEROV BIOLOGICKÝ TEST U POTKANOV: KRÁTKODOBÝ SKRÍNINGOVÝ TEST NA (ANTI)ANDROGÉNNE VLASTNOSTI

B.56. ROZŠÍRENÁ JEDNOGENERAČNÁ ŠTÚDIA REPRODUKČNEJ TOXICITY

B.57. SKÚŠKA STEROIDOGENÉZY H295R

B.58. TRANSGÉNNA SKÚŠKA GÉNOVEJ MUTÁCIE NA SOMATICKÝCH BUNKÁCH HLODAVCOV A SKÚŠKA GÉNOVEJ MUTÁCIE NA ZÁRODOČNÝCH BUNKÁCH

B.59. KOŽNÁ SENZIBILIZÁCIA *IN CHEMICO*: SKÚŠKA PRIAMEJ PEPTIDOVEJ REAKTIVITY (DPRA)

B.60. KOŽNÁ SENZIBILIZÁCIA *IN VITRO*: TESTOVACIA METÓDA „ARE-NRF2 LUCIFERÁZA“

B.61. TESTOVACIA METÓDA ÚNIKU FLUORESCEÍNU NA ZISŤOVANIE OČNÝCH ŽIERAVÍN A SILNE DRÁŽDIVÝCH LÁTOK

B.62. ALKALICKÝ KOMÉTOVÝ TEST *IN VIVO* U CICAVCOV

▼B

B.63. SKRÍNINGOVÝ TEST REPRODUKČNEJ/VÝVOJOVEJ TOXICITY

B.64. KOMBINOVANÁ ŠTÚDIA TOXICITY PO OPAKOVANÝCH DÁVKACH SO SKRÍNINGOVÝM TESTOM REPRODUKČNEJ/VÝVOJOVEJ TOXICITY

B.65. METÓDA NA TESTOVANIE POLEPTANIA KOŽE S VYUŽITÍM MEMBRÁNOVEJ BARIÉRY *IN VITRO*

B.66. STABILNE TRANSFEKTOVANÁ TRANSAKTIVÁCIA V SKÚŠKACH *IN VITRO* NA ZISŤOVANIE AGONISTOV A ANTAGONISTOV ESTROGÉNOVÝCH RECEPTOROV

B.67. *IN VITRO* TESTY NA GÉNOVÉ MUTÁCIE CICAVČÍCH BUNIEK S VYUŽITÍM GÉNU TYMIDÍNKINÁZY

B.68. TESTOVACIA METÓDA KRÁTKODOBEJ EXPOZÍCIE *IN VITRO* NA IDENTIFIKÁCIU i) CHEMIKÁLIÍ VYVOLÁVAJÚCICH VÁŽNE POŠKODENIE OČÍ A ii) CHEMIKÁLIÍ, KTORÉ SI NEVYŽADUJÚ KLASIFIKÁCIU AKO CHEMIKÁLIE SPÔSOBUJÚCE PODRÁŽDENIE OČÍ ALEBO VÁŽNE POŠKODENIE OČÍ

B.69. TESTOVACIA METÓDA S VYUŽITÍM REKONŠTRUOVANÉHO EPITELU PODOBNÉHO ĽUDSKEJ ROHOVKE (RhCE) NA IDENTIFIKÁCIU CHEMIKÁLIÍ, KTORÉ SI NEVYŽADUJÚ KLASIFIKÁCIU A OZNAČOVANIE AKO CHEMIKÁLIE SPÔSOBUJÚCE PODRÁŽDENIE OČÍ ALEBO VÁŽNE POŠKODENIE OČÍ

B.70. SKÚŠKY *IN VITRO* S VYUŽITÍM ĽUDSKÉHO REKOMBINANTNÉHO ESTROGÉNOVÉHO RECEPTORA (hrER) NA ZISŤOVANIE CHEMIKÁLIÍ S AFINITOU K ESTROGÉNOVÉMU RECEPTORU

B.71. SKÚŠKY KOŽNEJ SENZIBILIZÁCIE *IN VITRO* SO ZAMERANÍM NA KĽÚČOVÚ UDALOSŤ AKTIVÁCIE DENDRITOVÝCH BUNIEK V RÁMCI DRÁHY NEPRIAZNIVÉHO ÚČINKU (AOP) KOŽNEJ SENZIBILIZÁCIE

▼B

VŠEOBECNÝ ÚVOD

A. **KLASIFIKÁCIA TESTOVANEJ LÁTKY**

Pred začatím toxikologickej štúdie musí byť známe zloženie testovanej látky, hlavné nečistoty a podstatné fyzikálno-chemické vlastnosti vrátane jej stability.

Fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej látky poskytujú dôležité informácie pri výbere spôsobu použitia, plánovaní každého detailu štúdie a pri manipulácii s testovanou látkou a pri jej skladovaní.

Začatiu štúdie musí predchádzať vývoj analytickej metódy pre kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie testovanej látky (vrátane hlavných nečistôt, ak je možné) v testovanom a biologickom materiáli.

V správe z testu musia byť uvedené všetky informácie týkajúce sa identifikácie, fyzikálno-chemických vlastností, čistoty a správania testovanej látky.

B. **STAROSTLIVOSŤ O ZVIERATÁ**

Pri toxikologickom testovaní je dôležitá prísna kontrola životných podmienok a vhodnej starostlivosti o zvieratá.

i) *Podmienky bývania*

Životné podmienky v experimentálnych zverincoch alebo ohradách musia byť vhodné pre testovaný druh. Pre potkany, myši a morčatá je vhodná teplota miestnosti 22 ^{o}C ± 3 ^{o}C s relatívnou vlhkosťou od 30 % do 70 %. Pre králiky je to teplota 20 ^{o}C ± 3 ^{o}C s relatívnou vlhkosťou od 30 % do 70 %.

Niektoré experimentálne postupy sú najmä citlivé na teplotu a v týchto prípadoch bývajú podrobnosti uvedené v opise metódy testovania. Pri všetkých sledovaniach toxických účinkov sa sleduje tiež teplota a vlhkosť, zaznamenáva sa a uvádza sa v záverečnej správe štúdie.

Osvetlenie má byť umelé v intervaloch 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Detaily o vlastnostiach osvetlenia sa zaznamenávajú a uvádzajú v záverečnej správe štúdie.

Zvieratá sa držia jednotlivo alebo sú umiestnené v klietkach v malých skupinách toho istého pohlavia, iba ak je to v metóde uvedené; v jednej klietke nesmie byť umiestnených viac ako päť zvierat.

V správe k pokusom so zvieratami sa uvádza spôsob ich umiestnenia v klietkach, počet zvierat v každej klietke aj počas expozície chemikáliou aj počas nasledujúceho obdobia pozorovania.

▼B

ii) *Podmienky kŕmenia*

Strava musí vyhovovať výživovým požiadavkám testovaného druhu. Ak sa testované látky podávajú zvieratám v strave, môžu sa nutričné hodnoty znížiť interakciou medzi látkou a zložkami potravy. Pri interpretácii výsledkov testu sa musí vziať do úvahy možnosť takýchto reakcií. Bežná laboratórna strava sa podáva s neobmedzeným prídelom pitnej vody. Výber potravy môže byť ovplyvnený potrebou zaistenia vhodného prídavku testovanej látky pri použití danej metódy.

Kontaminanty potravy, o ktorých je známe, že vplývajú na toxicitu, nesmú byť prítomné v koncentráciách, ktoré by rušili testovanie.

C. **ALTERNATÍVNE TESTOVANIE**

Európska únia sa zaviazala podporiť vývoj a hodnotenie alternatívnych postupov, ktoré poskytnú takú istú úroveň informácií ako súčasné štúdie na zvieratách, ale ktoré používajú menej zvierat, spôsobujú menej utrpenia alebo sa vyhýbajú ich použitiu úplne.

Tieto metódy, tak ako sa zavádzajú, treba brať do úvahy všade tam, kde možno uskutočniť charakterizáciu rizika a následnú klasifikáciu a opísanie vlastného rizika.

D. **VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA**

Po vyhodnotení a interpretovaní testov sa berú do úvahy obmedzenia v rozsahu, v ktorom boli výsledky štúdií na zvieratách a štúdií *in vitro* extrapolované priamo na človeka, a z toho dôvodu sa dôkaz nepriaznivého účinku na človeka, pokiaľ je prístupný, používa na potvrdenie výsledkov testovania.

E. **ODPORÚČANÁ LITERATÚRA**

Väčšina uvedených metód sa vyvíja v rámci programu OECD pre zásady testovania a uskutočňuje sa v zhode so zásadami správnej laboratórnej praxe s cieľom zaistenia „vzájomnej akceptácie údajov“ v takom rozsahu, ako je len možné.

Ďalšie informácie sa dajú získať v odkazoch uvedených v zásadách OECD a v príslušnej inde uvedenej literatúre.

▼B

B.1a. **AKÚTNA ORÁLNA TOXICITA – METÓDA STABILNEJ DÁVKY**

1. **METÓDA**

Táto testovacia metóda je rovnocenná s OECD TG 420 (2001).

1.1. ÚVOD

Tradičné metódy na hodnotenie akútnej toxicity využívajú smrť zvierat ako konečný bod. V roku 1984 Britská toxikologická spoločnosť navrhla novú koncepciu testovania akútnej toxicity založenú na podávaní série stabilných dávok (1). Koncepcia nevyužíva smrť zvierat ako konečný bod a vychádza namiesto toho z pozorovaní jasných príznakov toxicity pri jednej zo série stabilných dávok. Po validačných štúdiách *in vivo* v Spojenom kráľovstve (2) a aj v medzinárodných štúdiách *in vivo* sa tento postup prijal ako testovacia metóda v roku 1992. Následne sa štatistické vlastnosti metódy stabilnej dávky hodnotili s použitím matematických modelov v rade štúdií (4) (5) (6). Štúdie *in vivo* a modelové štúdie spolu názorne ukázali, že metóda je reprodukovateľná, používa sa pri nej menej zvierat a spôsobuje menej utrpenia ako tradičné metódy a umožňuje zatriediť látky podobne ako iné testovacie metódy akútnej toxicity.

Usmernenie pre výber najvhodnejšej testovacej metódy na daný účel možno nájsť v Usmerňujúcom dokumente o testovaní akútnej orálnej toxicity (Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing) (7). Tento usmerňujúci dokument obsahuje aj doplňujúce informácie o vykonávaní a interpretácii testovacej metódy B.1a.

Princípom tejto metódy je, že v základnej štúdii sa používajú iba mierne toxické dávky a že je potrebné vyhýbať sa podávaniu dávok, pri ktorých sa očakáva, že sú smrteľné. Nie je tiež potrebné podávať dávky, o ktorých je známe, že spôsobujú silnú bolesť a utrpenie následkom leptavých alebo silne dráždivých účinkov. Moribundné zvieratá alebo zvieratá so zrejmými bolesťami alebo vykazujúcimi známky silného a pretrvávajúceho utrpenia sa humánnym spôsobom usmrtia a pri interpretácii výsledkov testu sa vyhodnotia ako zvieratá, ktoré uhynuli pri teste. Kritériá na rozhodnutie usmrtiť moribundné alebo silne trpiace zvieratá a usmernenie o uznaní predvídateľnej alebo nastávajúcej smrti je predmetom samostatného usmerňovacieho dokumentu (8).

Metóda poskytuje informácie o nebezpečných vlastnostiach a umožňuje, aby sa látka mohla zatriediť a klasifikovať podľa Globálne harmonizovaného systému (GHS) pre klasifikáciu chemikálií, ktoré spôsobujú akútnu toxicitu (9).

Testovacie laboratórium posúdi všetky dostupné informácie o testovanej látke pred uskutočnením štúdie. Takéto informácie budú obsahovať identitu a chemickú štruktúru látky, jej fyzikálno-chemické vlastnosti, výsledky všetkých ostatných *in vitro* alebo *in vivo* testov toxicity s látkou, toxikologické údaje o štrukturálne príbuzných látkach a predpokladané použitie(-ia) látky. Tieto informácie sú potrebné na ubezpečenie všetkých zainteresovaných, že test je relevantný na ochranu zdravia ľudí a pomôže pri výbere vhodnej počiatočnej dávky.

▼B

1.2. DEFINÍCIE

Akútna orálna toxicita: vzťahuje sa na tie nepriaznivé účinky, ktoré sa vyskytnú po orálnom podaní jednorazovej dávky látky alebo viacnásobných dávok podávaných v priebehu 24 hodín.

Oneskorená smrť: znamená, že zviera neuhynie ani sa nejaví, že je moribundné, v priebehu 48 hodín, ale uhynie neskôr v priebehu 14-dňového obdobia pozorovania.

Dávka: množstvo podanej testovanej látky. Dávka je vyjadrená ako hmotnosť testovanej látky na jednotku hmotnosti pokusného zvieraťa (napr. mg/kg).

Zrejmá toxicita: všeobecný termín opisujúci jasné príznaky toxicity po podaní testovanej látky [príklady pozri v (3)], ktoré sú také, že pri podaní najbližšej najvyššej stabilnej dávky sa dá očakávať buď silná bolesť a pretrvávajúce príznaky silného utrpenia, moribundný stav [kritériá sú uvedené v Humane Endpoints Guidance Document (8)], alebo pravdepodobná mortalita u väčšiny zvierat.

GHS: Globálne harmonizovaný klasifikačný systém pre chemické látky a zmesi. Spoločný projekt OECD (zdravie ľudí a životné prostredie), Výboru expertov OSN pre prepravu nebezpečného tovaru (fyzikálno-chemické vlastnosti) a ILO (oznamovanie nebezpečenstva) a koordinovaný v rámci Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC).

Blížiaca sa smrť: keď sa očakáva moribundný stav pred ďalším plánovaným obdobím pozorovania. Príznaky, ktoré sú príznačné pre tento stav u hlodavcov, by mohli zahŕňať kŕče, polohu na boku, polohu v ľahu a triašku. [Ďalšie informácie pozri v Humane Endpoint Guidance Document (8).]

LD_{50} (stredná smrteľná dávka): je štatistický odvodená jednorazová dávka látky, pri ktorej sa dá očakávať, že spôsobí úhyn 50 % zvierat po orálnom podaní. Hodnota LD_{50} je vyjadrená ako hmotnosť testovanej látky na jednotku hmotnosti pokusného zvieraťa (mg/kg).

Limitná dávka: sa vzťahuje na dávku nad hornou hranicou testovania (2 000 alebo 5 000 mg/kg).

Moribundný stav: stav umierania alebo neschopnosti prežiť, dokonca aj pri liečbe. [Ďalšie informácie pozri v Humane Endpoint Guidance Document (8).]

Predvídateľná smrť: prítomnosť klinických príznakov charakteristických pre smrť v známom čase v budúcnosti pred plánovaným ukončením experimentu, napríklad neschopnosť prijímať vodu alebo jedlo. [Ďalšie informácie pozri v Humane Endpoint Guidance Document (8).]

▼B

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Skupine zvierat rovnakého pohlavia sa postupne podávajú stabilné dávky 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg (výnimočne sa môže uvažovať o podaní ďalšej stabilnej dávky 5 000 mg/kg, pozri oddiel 1.6.2). Na základe predbežnej štúdie sa zvolí počiatočná dávka, pri ktorej sa očakáva, že spôsobí určité príznaky toxicity bez toho, aby spôsobila vážne toxické účinky alebo mortalitu. Klinické príznaky a podmienky, ktoré sa spájajú s bolesťou, utrpením a blížiacou sa smrťou, sú podrobne uvedené v samostatnom usmerňovacom dokumente OECD (8). Ďalším skupinám zvierat sa môžu podávať vyššie alebo nižšie stabilné dávky v závislosti od prítomnosti alebo neprítomnosti príznakov toxicity alebo mortality. Tento postup pokračuje po dávku spôsobujúcu zrejmú toxicitu alebo po zistenie najviac jedného uhynutia, alebo keď nie sú viditeľné žiadne účinky pri najvyššej dávke, alebo keď sa vyskytnú uhynutia pri najnižšej dávke.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Výber druhu zvierat**

Spomedzi živočíchov z druhu hlodavcov sa pokiaľ možno používa potkan, aj keď sa môže použiť aj iný druh hlodavca. Zvyčajne sa používajú samice (7). Je to preto, že prehľady bežných LD_{50} testov uverejnené v odbornej literatúre uvádzajú, že zvyčajne je malý rozdiel v citlivosti medzi pohlaviami, ale v tých prípadoch, keď sa pozorujú rozdiely, sú samice zvyčajne mierne citlivejšie (10). Ak však z poznatkov o toxikologických alebo toxikokinetických vlastnostiach štrukturálne príbuzných chemikálií vyplýva, že samce môžu byť citlivejšie, potom sa použije toto pohlavie. Ak sa test uskutočňuje na samcoch, je potrebné uviesť primerané zdôvodnenie.

Používajú sa zdravé mladé dospelé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Samice majú byť panenské a negravidné. Každé zviera má byť na začiatku dávkovania vo veku od 8 do 12 týždňov a jeho hmotnosť má byť v intervale ± 20 % priemernej hmotnosti všetkých zvierat, ktorým sa predtým podala dávka.

1.4.2. **Podmienky umiestnenia a kŕmenia**

Teplota miestnosti pre pokusné zvieratá má byť 22 °C (± 3 °C). Aj keď relatívna vlhkosť má byť aspoň 30 % a nemala by prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti má dosahovať 50 % – 60 %. Osvetlenie má byť umelé, v rytme 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Zvieratá môžu byť v klietkach po skupinách podľa dávok, ale počet zvierat na klietku musí umožniť zreteľné pozorovanie každého zvieraťa.

1.4.3. **Príprava zvierat**

Zvieratá sú náhodne vybrané, označené tak, aby sa umožnila jednotlivá identifikácia, a držia sa v klietkach aspoň 5 dní pred začiatkom podávania látky, aby sa im umožnila aklimatizácia na laboratórne podmienky.

▼B

1.4.4. **Príprava dávok**

Testované látky sa zvyčajne podávajú v stálom objeme počas celého rozsahu dávok, ktoré sa majú testovať zmenou koncentrácie dávkovaného prípravku. Ak sa však má testovať kvapalný konečný produkt alebo zmes, použitie neriedenej testovanej látky, t. j. pri konštantnej koncentrácii, môže byť vhodnejšie pre následné stanovenie rizika tejto látky a požadujú ho niektoré regulačné orgány. V každom prípade sa nesmie prevýšiť maximálny objem podávanej dávky. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. U hlodavcov by objem zvyčajne nemal presiahnuť 1 ml/100 g telesnej hmotnosti: v prípade vodných roztokov sa však môže uvažovať o 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Pokiaľ ide o zloženie dávkovaného prípravku, odporúča sa, pokiaľ je to možné, použitie vodného roztoku/suspenzie/emulzie, za ktorým v poradí nasleduje roztok/suspenzia/emulzia v oleji (napr. kukuričný olej) a potom prípadne roztok v iných nosičoch. Pre nosiče, ktoré sú iné ako voda, by mali byť známe toxikologické charakteristiky. Dávky musia byť pripravené tesne pred podávaním, pokiaľ nie je známa a prijateľná stabilita prípravku počas jeho používania.

1.5. POSTUP

1.5.1. **Podávanie dávok**

Testovaná látka sa podáva ako jednorazová dávka cez sondu s použitím žalúdočnej sondy alebo vhodnej intubačnej kanyly. Za nezvyčajných okolností, keď nie je možná jednorazová dávka, môže sa dávka podávať v menších množstvách v priebehu maximálne 24 hodín.

Zvieratá sa pred podaním dávky vyhladujú (napr. potkanom sa cez noc zadrží potrava, ale nie voda; myšiam sa na 3 – 4 hodiny zadrží potrava, ale nie voda). Po období hladovania sa zvieratá odvážia a podá sa im testovaná látka. Po podaní látky sa potrava môže zadržať na ďalšie 3 – 4 hodiny potkanom alebo myšiam na 1 – 2 hodiny. Ak sa dávka podáva po častiach počas určitého obdobia, môže byť potrebné poskytnúť zvieratám potravu a vodu v závislosti od dĺžky obdobia.

1.5.2. **Predbežná štúdia**

Účelom predbežnej štúdie je umožniť výber vhodnej počiatočnej dávky pre základnú štúdiu. Testovaná látka sa podáva jednotlivým zvieratám postupne podľa postupového diagramu v prílohe 1. Predbežná štúdia je hotová, keď možno vykonať rozhodnutie o počiatočnej dávke pre základnú štúdiu (alebo ak sa vyskytne uhynutie pri najnižšej stabilnej dávke).

Počiatočná dávka sa v prípade predbežnej štúdie vyberie zo stabilných dávok 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg ako dávka, pri ktorej sa očakáva, že spôsobí zrejmú toxicitu, ktorá je založená pokiaľ možno na dôkaze z *in vivo* a *in vitro* údajov pre tú istú chemikáliu a pre štrukturálne príbuzné chemikálie. Ak takéto informácie chýbajú, bude počiatočná dávka 300 mg/kg.

Medzi podaním jednotlivých dávok každému zvieraťu je časový interval aspoň 24 hodín. Všetky zvieratá sa pozorujú aspoň 14 dní.

▼B

Výnimočne, a iba v odôvodnených prípadoch na základe osobitných regulačných potrieb, sa môže zohľadniť použitie ďalšej vyššej stabilnej dávky 5 000 mg/kg (pozri prílohu 3). Z dôvodu starostlivosti o zvieratá sa pokusy na zvieratách v rozsahoch GHS kategórie 5 (2 000 – 5 000 mg/kg) neodporúčajú a uvážia sa iba v prípade veľkej pravdepodobnosti, že výsledky takéhoto testu sú bezprostredne dôležité pre ochranu zdravia ľudí a zvierat alebo ochranu životného prostredia.

V prípadoch, keď zviera testované pri najnižšej stabilnej dávke (5 mg/kg) v predbežnej štúdii uhynie, je zvyčajným postupom, že štúdia sa ukončí a látka sa zaradí do GHS kategórie 1 (ako je uvedené v prílohe 1). Ak sa však vyžaduje ďalšie potvrdenie klasifikácie, môže sa vykonať tento voliteľný doplnkový postup. Druhému zvieraťu sa podá dávka 5 mg/kg. Ak toto druhé zviera uhynie, potom sa potvrdí GHS kategória 1 a štúdia sa ihneď ukončí. Ak druhé zviera prežije, potom sa maximálne trom ďalším zvieratám podá dávka 5 mg/kg. Pre výskyt veľkého rizika mortality sa týmto zvieratám z dôvodu starostlivosti o zvieratá podá dávka postupne. Časový interval medzi podaním dávky každému zvieraťu má byť dostatočný na to, aby sa stanovila pravdepodobnosť prežitia predchádzajúceho zvieraťa. Ak sa vyskytne druhé uhynutie, postupnosť podávania dávok sa ihneď ukončí a žiadnym ďalším zvieratám sa dávky nepodajú. Keďže výskyt druhého uhynutia (bez ohľadu na počet pokusných zvierat v čase ukončenia) patrí do výsledku A (2 alebo viac uhynutí), postupuje sa podľa klasifikačného pravidla prílohy 2 pri stabilnej dávke 5 mg/kg (kategória 1, ak sa vyskytne 2 alebo viac uhynutí, alebo kategória 2, ak sa nevyskytne viac ako 1 uhynutie). Okrem toho príloha 4 poskytuje usmernenie pre klasifikáciu v systéme EÚ, až kým sa nezavedie nový GHS.

1.5.3. **Základná štúdia**

1.5.3.1. *Počet zvierat a dávky*

Opatrenia, ktoré sa majú prijať po testovaní s počiatočnou dávkou, sa uvádzajú v postupových diagramoch v prílohe 2. Vyžaduje sa jedno z troch opatrení; buď sa testovanie ukončí a priradí príslušná trieda klasifikácie nebezpečenstva, testuje sa pri vyššej stabilnej dávke, alebo sa testuje pri nižšej stabilnej dávke. Na ochranu zvierat sa však v základnej štúdii nezopakuje dávka, ktorá spôsobila uhynutie v predbežnej štúdii (pozri prílohu 2). Zo skúseností vyplýva, že najpravdepodobnejším výsledkom pri počiatočnej dávke bude to, že látku možno klasifikovať, a nie je potrebné ďalšie testovanie.

Zvyčajne sa používa celkove päť zvierat rovnakého pohlavia pre každú skúmanú dávku. K týmto piatim zvieratám patrí jedno zviera z predbežnej štúdie, ktorému sa podala zvolená dávka, a ďalšie štyri zvieratá (okrem výnimočného prípadu, keď sa dávka použitá v základnej štúdii nezahrnula do predbežnej štúdie).

Časový interval medzi dávkovaním s každou veľkosťou dávky je určený nástupom, trvaním a závažnosťou príznakov toxicity. Ďalšia dávka sa podá zvieratám až po ubezpečení, že zvieratá, ktorým sa predtým podala dávka, prežili. Podľa potreby sa odporúča interval 3 alebo 4 dni medzi jednotlivými dávkami, aby sa umožnilo pozorovanie oneskorenej toxicity. Časový interval sa môže nastaviť podľa potreby, napr. v prípade nepresvedčivej reakcie.

▼B

Ak sa uvažuje o použití vyššej stabilnej dávky 5 000 mg/kg, postupuje sa podľa postupu uvedeného v prílohe 3 (pozri tiež oddiel 1.6.2).

1.5.3.2. *Limitný test*

Limitný test sa pokiaľ možno používa v situáciách, keď experimentátor má informácie, z ktorých vyplýva, že testovaný materiál je pravdepodobne netoxický, t. j. že je toxický iba v prípade, keď prevyšuje predpismi stanovené limitné dávky. Informácie o toxicite testovaného materiálu možno získať z poznatkov o podobných testovaných látkach alebo podobných testovaných zmesiach alebo produktoch pri zohľadnení identity a percenta zložiek, o ktorých je známe, že sú toxikologicky významné. V tých situáciách, keď je málo informácií alebo nie sú informácie o jeho toxicite, alebo v ktorých sa očakáva, že testovaný materiál bude toxický, je potrebné vykonať základný test.

Pri zvyčajnom postupe sa počiatočná dávka predbežnej štúdie 2 000 mg/kg (alebo výnimočne 5 000 mg/kg) následne podá ďalším štyrom zvieratám, čo slúži ako limitný test v prípade tohto usmernenia.

1.6. POZOROVANIA

Zvieratá sa vyšetrujú individuálne po podaní dávky aspoň raz počas prvých 30 minút, pravidelne počas prvých 24 hodín, osobitne pozorne počas prvých 4 hodín, a potom každý deň počas celkove 14 dní okrem prípadu, keď je potrebné zvieratá vylúčiť zo štúdie a z dôvodu starostlivosti o zvieratá humánnym spôsobom usmrtiť alebo keď sa zistí, že uhynuli. Dĺžka pozorovania by sa však nemala pevne určiť. Určí sa na základe toxických reakcií, času nástupu a dĺžky času zotavenia a malo by sa teda umožniť jej predĺženie, ak sa to pokladá za potrebné. Časy, keď sa objavia a zmiznú príznaky toxicity, sú dôležité, predovšetkým v prípade tendencie oneskorenia toxických príznakov (11). Všetky pozorovania sa systematicky zaznamenajú, pričom každé zviera má individuálny záznam.

Ďalšie vyšetrenia budú potrebné, ak zvieratá naďalej vykazujú príznaky toxicity. Pri vyšetreniach sa venuje pozornosť zmenám na pokožke a srsti, očiach a slizniciach a tiež respiračnému, obehovému, autonómnemu a centrálnemu nervovému systému a somatomotorickej aktivite a spôsobu správania. Pozornosť sa zameriava na pozorovanie triašky, kŕčov, slinenia, hnačky, letargie, spánku a kómy. Zohľadnia sa zásady a kritériá zosumarizované v Humane Endpoints Guidance Document (8). Zvieratá nachádzajúce sa v moribundnom stave alebo tie, ktoré vykazujú silné bolesti alebo pretrvávajúce príznaky veľkého utrpenia, sa humánnym spôsobom usmrtia. Keď sa zvieratá usmrtia z humánnych dôvodov alebo sa nájdu uhynuté, je potrebné čo možno najpresnejšie zaznamenať čas uhynutia.

1.6.1. **Telesná hmotnosť**

Hmotnosť jednotlivých zvierat sa stanoví krátko pred podaním testovanej látky a potom aspoň každý týždeň. Zmeny hmotnosti sa vypočítajú a zaznamenajú. Na konci testu sa zvieratá, ktoré prežili, odvážia a potom humánnym spôsobom usmrtia.

▼B

1.6.2. **Patológia**

Všetky testované zvieratá (vrátane tých, ktoré uhynú počas testu alebo sú vylúčené zo štúdie z dôvodu starostlivosti o zvieratá) sa podrobia autopsii. Všetky makroskopické patologické zmeny u každého zvieraťa sa zaznamenajú. Môže sa uvažovať aj o mikroskopickom vyšetrení orgánov dokazujúcom makroskopické patologické nálezy u zvierat, ktoré prežili 24 alebo viac hodín po podaní počiatočnej dávky, ktoré môže poskytnúť užitočné informácie.

2. **ÚDAJE**

O jednotlivých zvieratách sa poskytujú informácie. Okrem toho sa všetky údaje zosumarizujú vo forme tabuliek, kde sa uvedie pre každú pokusnú skupinu počet použitých zvierat, počet zvierat vykazujúcich príznaky toxicity, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu, alebo boli usmrtené z humánnych dôvodov, čas uhynutia jednotlivých zvierat, popis časového priebehu toxických účinkov a reverzibility a pitevné nálezy.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí podľa potreby obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter, čistota a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti (vrátane izomerizácie),

— identifikačné údaje vrátane čísla CAS.

Nosič (v prípade potreby):

— zdôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda.

Pokusné zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— mikrobiologický stav zvierat, ak je známy,

— počet, vek a pohlavie zvierat (v prípade potreby vrátane zdôvodnenia, prečo sa použili samce namiesto samíc),

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

Testovacie podmienky:

— údaje o zložení testovanej látky vrátane údajov o fyzikálnej forme podávaného materiálu,

— údaje o podávaní testovanej látky vrátane objemov dávok a čase podávania,

— údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu krmiva/zdroja, zdroja vody),

— zdôvodnenie výberu počiatočnej dávky.

▼B

Výsledky:

— tabuľkové spracovanie údajov o reakcii a veľkosti dávky pre každé zviera (t. j. zvieratá vykazujúce príznaky toxicity vrátane mortality, povahy, závažnosti a trvania účinkov),

— tabuľkové spracovanie telesnej hmotnosti a zmien telesnej hmotnosti,

— hmotnosti jednotlivých zvierat v deň podania dávky, potom v týždňových intervaloch a v čase uhynutia alebo usmrtenia,

— dátum a čas uhynutia v prípade vopred naplánovaného usmrtenia,

— časový priebeh nástupu príznakov toxicity a či tieto príznaky boli reverzibilné pre každé zviera,

— pitevné nálezy a histopatologické nálezy pre každé zviera, ak sú k dispozícii.

Diskusia a interpretácia výsledkov.

Závery.

4. **ODKAZY**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, 85 – 92.

(2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, 279 – 291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., 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, 469 – 482.

(4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313 – 324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315 – 323. Human Exptl. Toxicol.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. Hum. Exp. Toxicol., 21, 183 – 196.

(7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. 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

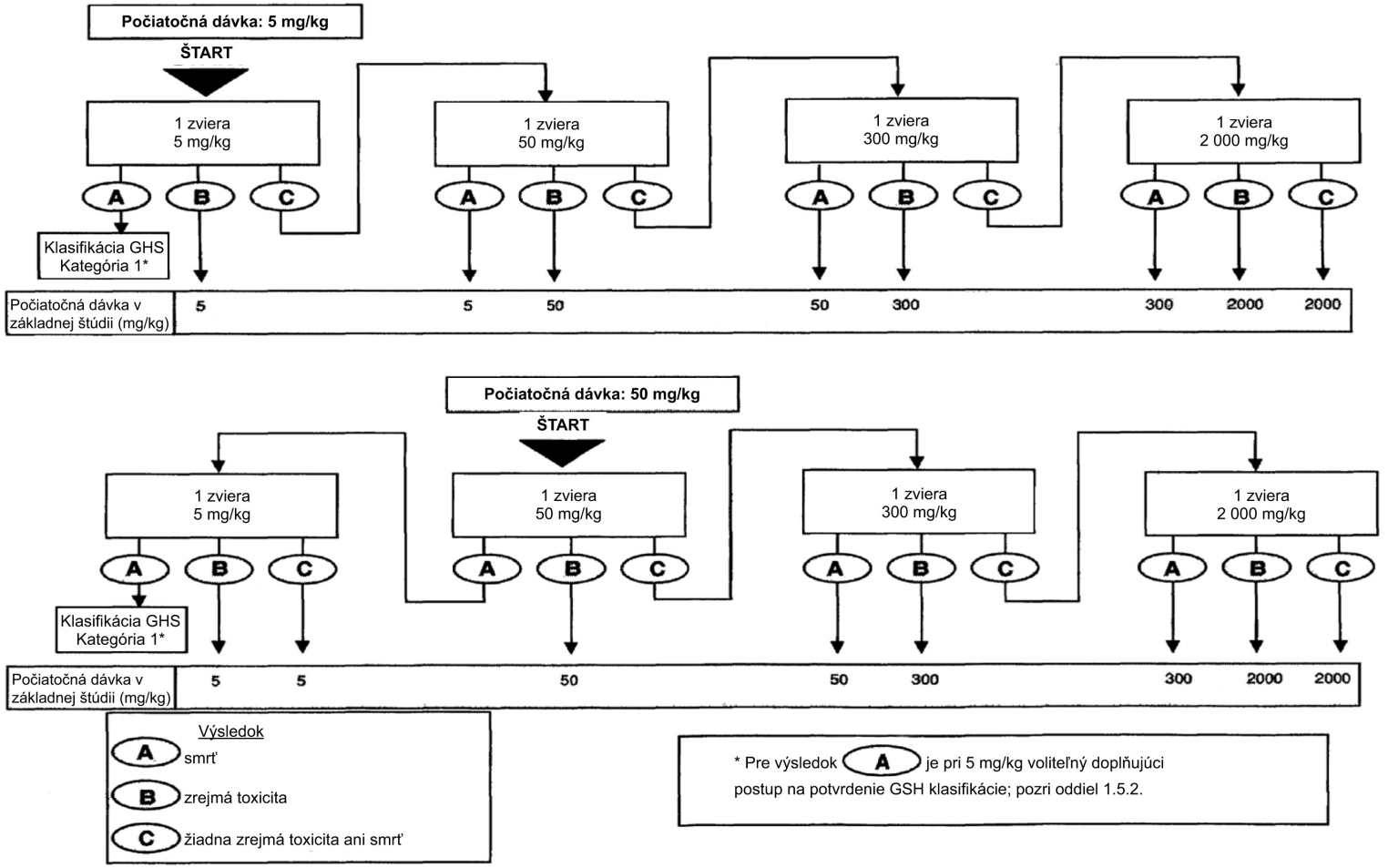
(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, s. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-1]. no-24-no-0,FF.html].

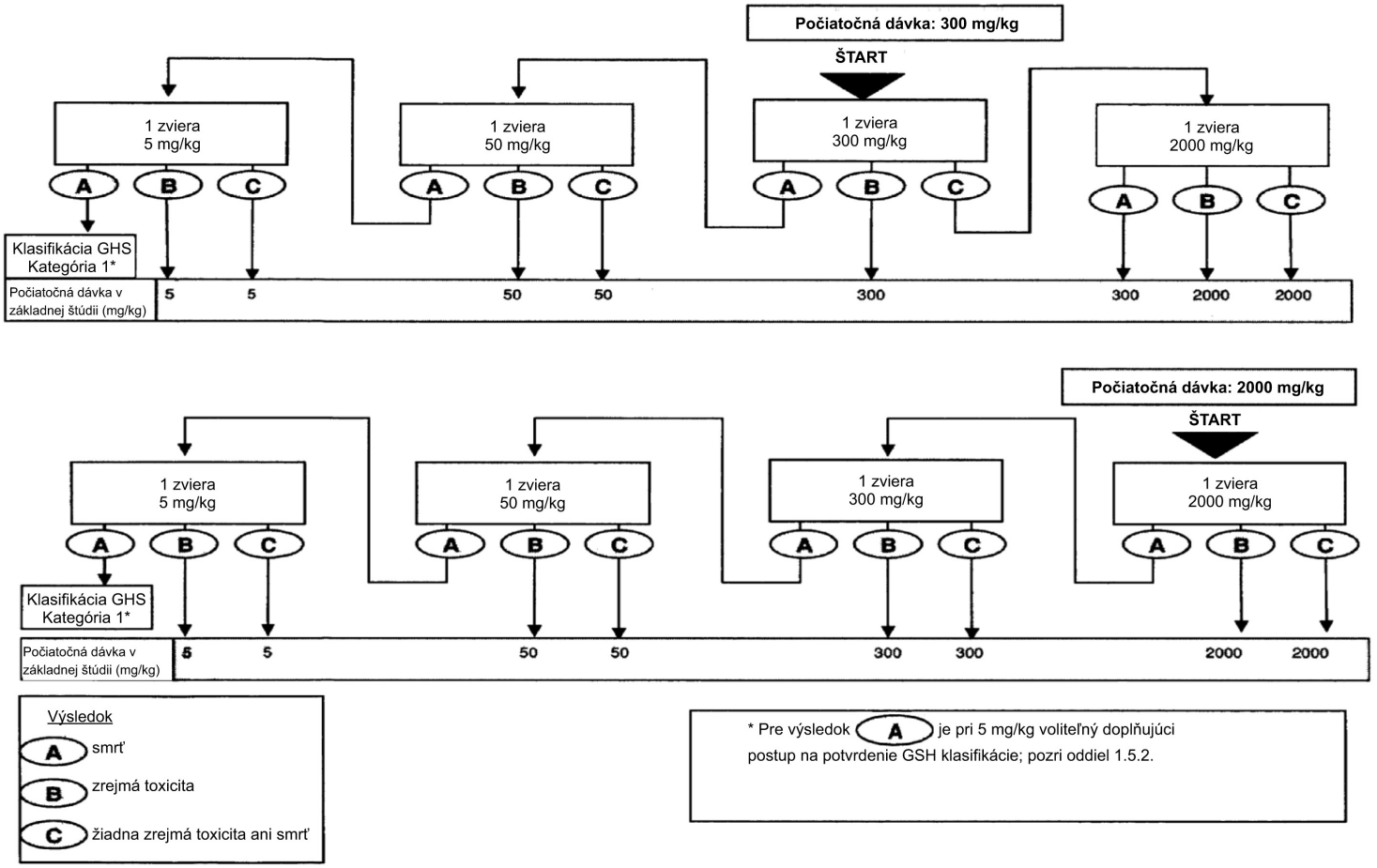
(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD50, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223 – 231.

(11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

PRÍLOHA 1:

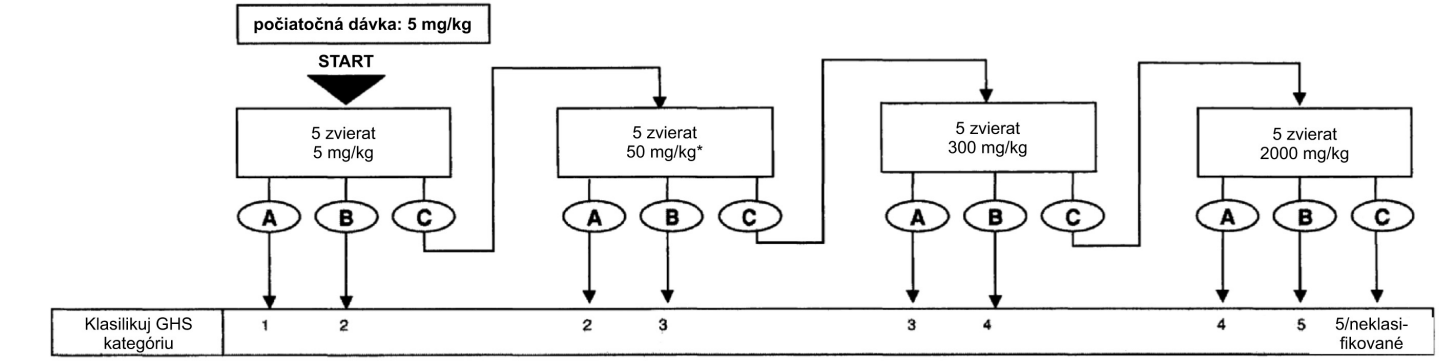
POSTUPOVÝ DIAGRAM PRE PREDBEŽNÚ ŠTÚDIU

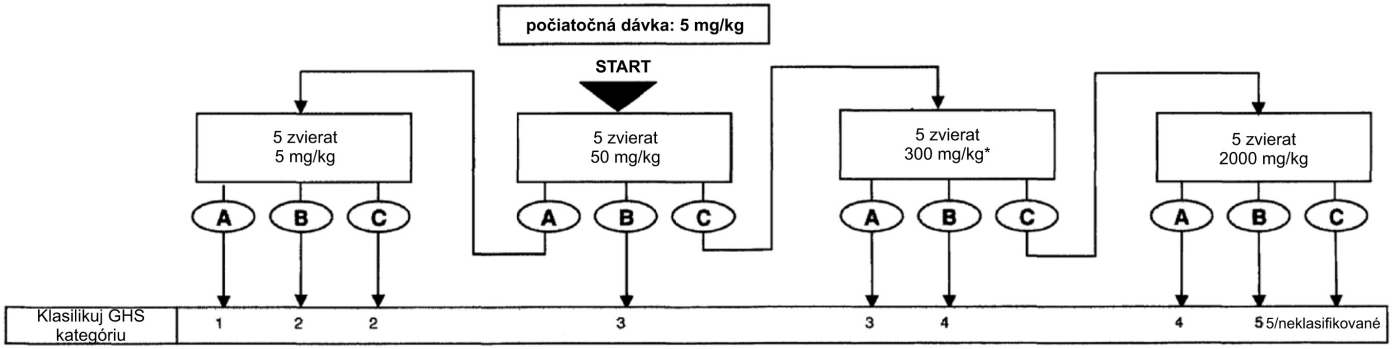



Počiatočná dávka: 300 mg/kg
ŠTART
1 zviera 5 mg/kg
1 zviera 50 mg/kg
1 zviera 300 mg/kg
1 zviera 2000 mg/kg
A B C
Klasifikácia GHS Kategória 1*
Počiatočná dávka v základnej štúdii (mg/kg)
5 5 50 50 300 300 2000 2000
Počiatočná dávka: 2000 mg/kg
ŠTART
1 zviera 5 mg/kg
1 zviera 50 mg/kg
1 zviera 300 mg/kg
1 zviera 2000 mg/kg
A B C
Klasifikácia GHS Kategória 1*
Počiatočná dávka v základnej štúdii (mg/kg)
5 5 50 50 300 300 2000 2000
Výsledok
A smrť
B zrejmá toxicita
C žiadna zrejmá toxicita ani smrť
* Pre výsledok A je pri 5 mg/kg voliteľný doplňujúci postup na potvrdenie GSH klasifikácie; pozri oddiel 1.5.2.

PRÍLOHA 2

POSTUPOVÝ DIAGRAM PRE ZÁKLADNÚ ŠTÚDIU





Výsledok

A ≥ 2 uhynutia

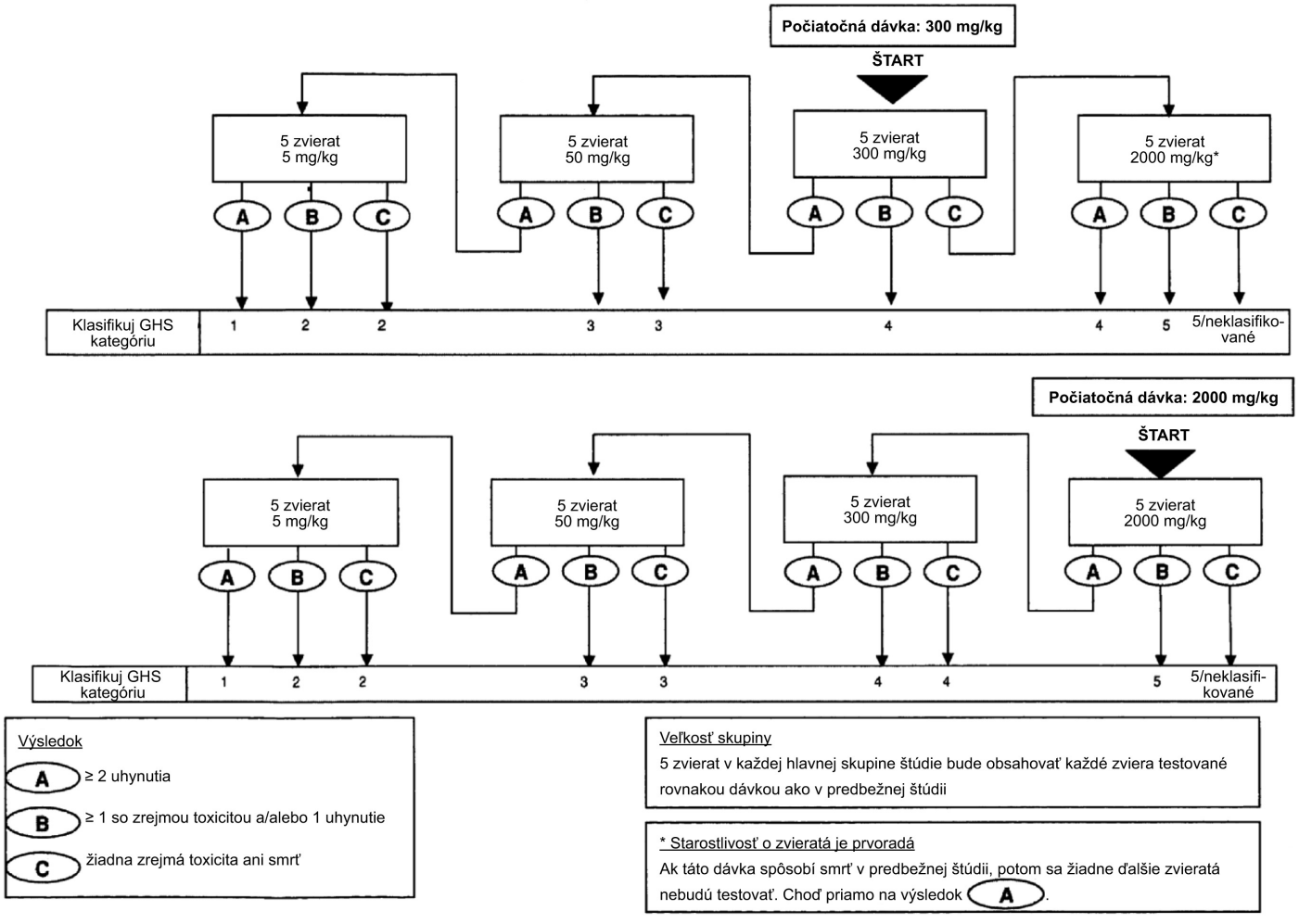
B ≥ 1 so zrejmou toxicitou a/alebo 1 uhynutie

C žiadna zrejmá toxicita ani smrť

Veľkosť skupiny
5 zvierat v každej hlavnej skupine štúdie bude obsahovať každé zviera testované rovnakou dávkou ako v predbežnej štúdii

* Starostlivosť o zvieratá je prvpradá
Ak táto dávka spôsobí smrť v predbežnej štúdii, potom sa žiadne ďalšie zvieratá nebudú testovať. Chod priamo na výsledok A

▼B


Počiatočná dávka: 300 mg/kg
ŠTART
5 zvierat 5 mg/kg
5 zvierat 50 mg/kg
5 zvierat 300 mg/kg
5 zvierat 2000 mg/kg*
A B C
Klasifikuj GHS kategóriu
1 2 2 3 3 4 4 5 5/neklasifiko-vané
Počiatočná dávka: 2000 mg/kg
ŠTART
5 zvierat 5 mg/kg
5 zvierat 50 mg/kg
5 zvierat 300 mg/kg
5 zvierat 2000 mg/kg
Klasifikuj GHS kategóriu
1 2 2 3 3 4 4 5 5/neklasifi-kované
Výsledok
A ≥ 2 uhynutia
B ≥ 1 so zrejmou toxicitou a/alebo 1 uhynutie
C žiadna zrejmá toxicita ani smrť
Veľkosť skupiny
5 zvierat v každej hlavnej skupine štúdie bude obsahovať každé zviera testované rovnakou dávkou ako v predbežnej štúdii
* Starostlivosť o zvieratá je prvoradá
Ak táto dávka spôsobí smrť v predbežnej štúdii, potom sa žiadne ďalšie zvieratá nebudú testovať. Choď priamo na výsledok A.

▼B

Príloha 3

KRITÉRIÁ KLASIFIKÁCIE TESTOVANÝCH LÁTOK S OČAKÁVANÝMI HODNOTAMI LD_{50} VYŠŠÍMI AKO 2 000 MG/KG, KTORÉ NIE JE POTREBNÉ TESTOVAŤ

Kritériá pre kategóriu nebezpečenstva 5 sú určené na umožnenie identifikácie testovaných látok s relatívne nízkym nebezpečenstvom akútnej toxicity, ale ktoré za určitých podmienok môžu predstavovať nebezpečenstvo pre zraniteľnejšie skupiny obyvateľstva. Predpokladá sa, že tieto látky majú orálnu alebo dermálnu LD_{50} v rozsahu 2 000 – 5 000 mg/kg alebo rovnocennú s dávkami pre iné spôsoby podávania. Testované látky sa klasifikujú do kategórie nebezpečenstva, ktorá je definovaná ako: 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (kategória 5 v GHS) v týchto prípadoch:

a) ak sú zaradené do tejto kategórie na základe niektorej testovacej schémy z prílohy 2 na základe výskytov mortality;

b) ak je už dostupný spoľahlivý dôkaz, z ktorého vyplýva, že LD_{50} je v rozsahu hodnôt kategórie 5, alebo z iných štúdií na zvieratách alebo toxických účinkov u ľudí vyplývajú obavy z akútnych dôsledkov pre zdravie ľudí;

c) pomocou extrapolácie, odhadu a merania údajov, ak nie je potvrdené zaradenie do vyššej triedy nebezpečenstva, a

— sú k dispozícii spoľahlivé informácie, z ktorých vyplývajú závažné toxické účinky u ľudí, alebo

— sa zistila mortalita pri testovaní s orálnym podávaním dávok až do hodnôt kategórie 4, alebo

— ak expertné posúdenie potvrdí závažné klinické príznaky toxicity pri testovaní až do hodnôt kategórie 4 okrem hnačky, zježenia alebo neupravenej srsti, alebo

— ak expertné posúdenie potvrdí spoľahlivé informácie, z ktorých vyplýva na základe iných štúdií na zvieratách možnosť závažných akútnych účinkov.

TESTOVANIE S DÁVKAMI NAD 2 000 MG/KG

Výnimočne a iba v odôvodnených prípadoch na základe osobitných regulačných potrieb sa môže zohľadniť použitie ďalšej vyššej stabilnej dávky 5 000 mg/kg. Vzhľadom na potrebu ochrany zvierat sa testovanie s 5 000 mg/kg neodporúča a môže sa uvážiť iba v prípade veľkej pravdepodobnosti, že výsledky takéhoto testu by mohli byť bezprostredne dôležité pre ochranu zdravia ľudí a zvierat (9).

Predbežná štúdia

Pravidlá rozhodnutia upravujúce postupovú metódu uvedenú v prílohe 1 sa rozširujú o dávku 5 000 mg/kg. Preto keď sa ako počiatočná dávka v predbežnej štúdii použije dávka 5 000 mg/kg, na základe výsledku A (smrť) bude potrebné, aby sa testovalo druhé zviera s dávkou 2 000 mg/kg; výsledky B a C (zrejmá toxicita alebo žiadna toxicita) umožnia, aby sa dávka 5 000 mg/kg zvolila ako počiatočná dávka v základnej štúdii. Podobne ak sa použije iná počiatočná dávka ako 5 000 mg/kg, potom testovanie pokračuje s 5 000 mg/kg na základe výsledkov B alebo C pri veľkosti dávky 2 000 mg/kg; následne výsledok A pri dávke 5 000 mg/kg predurčí počiatočnú dávku v základnej štúdii s veľkosťou dávky 2 000 mg/kg a výsledky B a C predurčia počiatočnú dávku pre základnú štúdiu s veľkosťou 5 000 mg/kg.

▼B

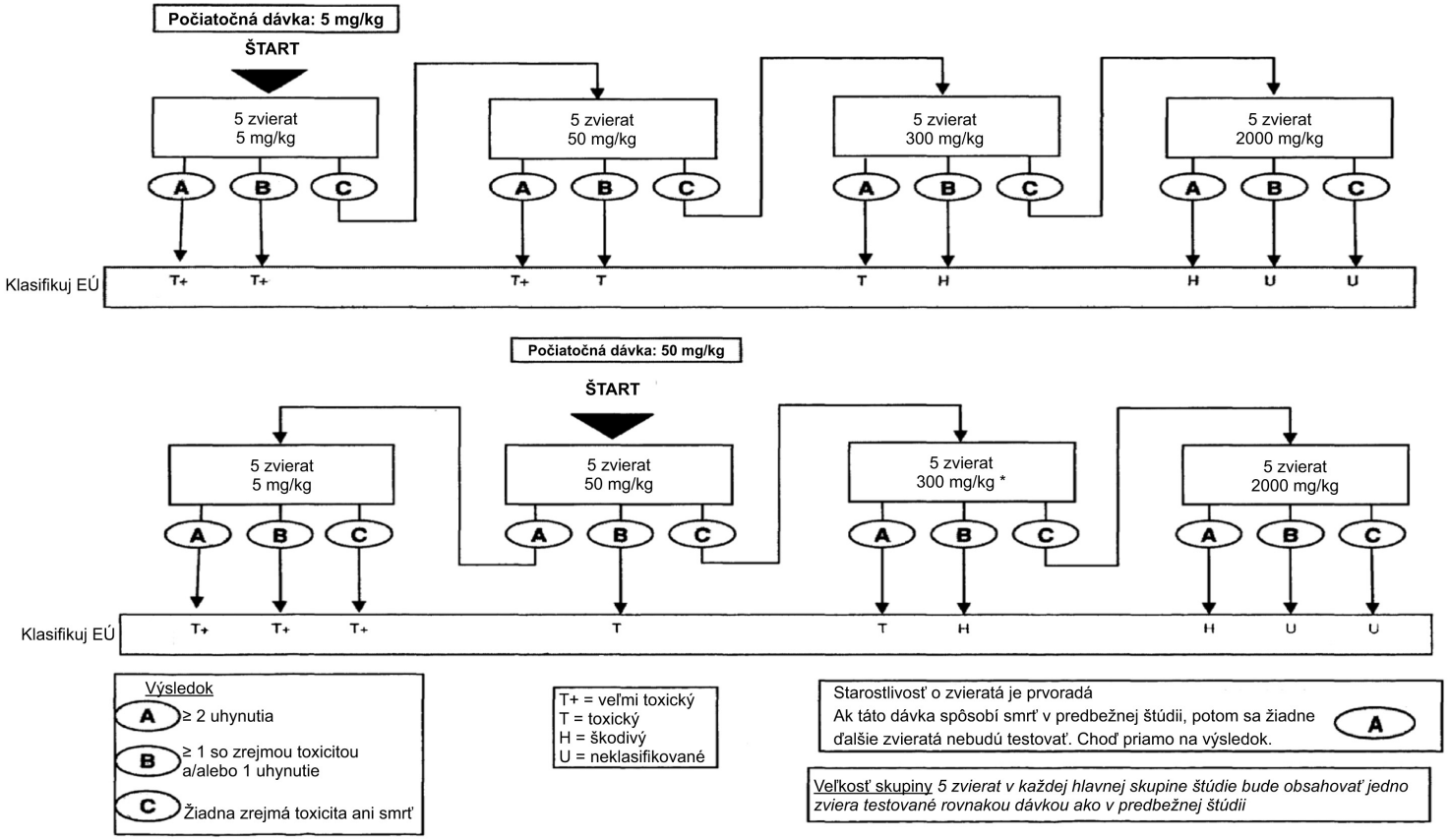
Základná štúdia

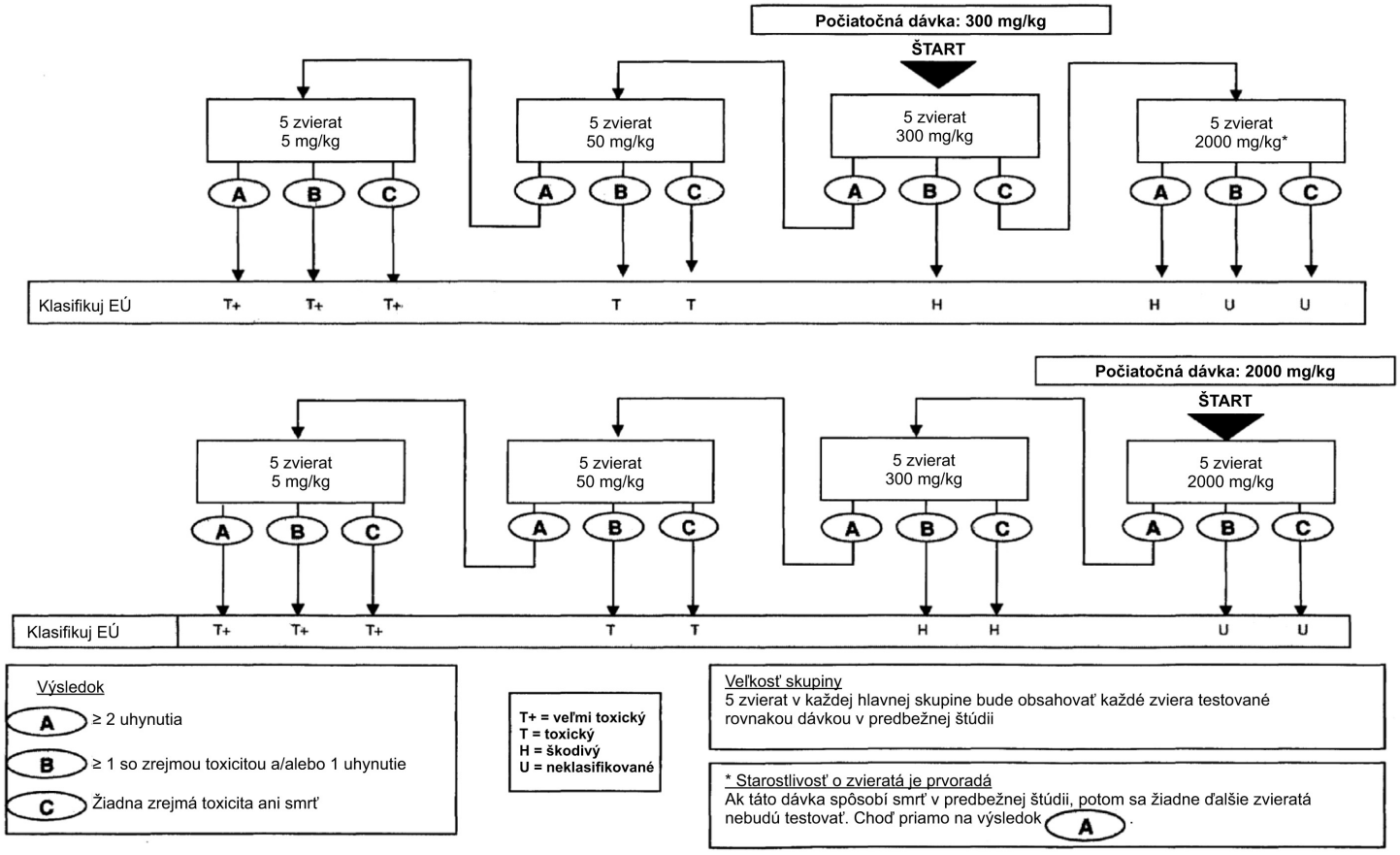
Pravidlá rozhodnutia upravujúce postupovú metódu uvedenú v prílohe 2 sa rozširujú o dávku 5 000 mg/kg. Preto keď sa ako počiatočná dávka v základnej štúdii použije dávka 5 000 mg/kg, na základe výsledku A (≥ 2 uhynuté zvieratá) bude potrebné, aby sa testovala druhá skupina zvierat s dávkou 2 000 mg/kg; výsledok B (zrejmá toxicita a/alebo ≤ 1 uhynuté zviera) alebo C (žiadna toxicita) bude mať za následok, že látka sa nebude klasifikovať podľa GHS. Podobne ak sa použije iná počiatočná dávka ako 5 000 mg/kg, potom testovanie pokračuje do 5 000 mg/kg na základe výsledku C pri veľkosti dávky 2 000 mg/kg; následne výsledok A pri dávke 5 000 mg/kg bude mať za následok, že látka sa zaradí do kategórie 5 GHS a výsledky B alebo C povedú k tomu, že sa látka nebude klasifikovať.

PRÍLOHA 4

TESTOVACIA METÓDA B.1a

Usmernenie pre klasifikáciu podľa schémy EÚ na prekonanie prechodného obdobia do úplného zavedenia Globálne harmonizovaného klasifikačného systému (GHS)




Počiatočná dávka: 300 mg/kg
ŠTART
5 zvierat 5 mg/kg
5 zvierat 50 mg/kg
5 zvierat 300 mg/kg
5 zvierat 2000 mg/kg*
A B C
Klasifikuj EÚ
T+ T+ T+ T T H H U U
Počiatočná dávka: 2000 mg/kg
ŠTART
5 zvierat 5 mg/kg
5 zvierat 50 mg/kg
5 zvierat 300 mg/kg
5 zvierat 2000 mg/kg
A B C
Klasifikuj EÚ
T+ T+ T+ T T H H U U
Výsledok
A ≥ 2 uhynutia
B ≥ 1 so zrejmou toxicitou a/alebo 1 uhynutie
C Žiadna zrejmá toxicita ani smrť
T+ = veľmi toxický
T = toxický
H = škodivý
U = neklasifikované
Veľkosť skupiny
5 zvierat v každej hlavnej skupine bude obsahovať každé zviera testované rovnakou dávkou v predbežnej štúdii
* Starostlivosť o zvieratá je prvoradá
Ak táto dávka spôsobí smrť v predbežnej štúdii, potom sa žiadne ďalšie zvieratá nebudú testovať. Choď priamo na výsledok A.

▼B

B.1b. AKÚTNA ORÁLNA TOXICITA – METÓDA TRIEDY AKÚTNEJ TOXICITY

1. METÓDA

Táto testovacia metóda je rovnocenná s OECD TG 423 (2001).

1.1. ÚVOD

Metóda triedy akútnej toxicity (1), uvedená v tomto teste, je postupnou metódou, pri ktorej sa na každý krok použijú 3 zvieratá rovnakého pohlavia. V závislosti od mortality a/alebo ich moribundného stavu môžu byť potrebné priemerne 2 až 4 kroky na posúdenie akútnej toxicity testovanej látky. Táto metóda je reprodukovateľná, používa sa pri nej veľmi málo zvierat a umožňuje zatriediť látky podobne ako iné testovacie metódy akútnej toxicity. Metóda triedy akútnej toxicity je založená na biometrických hodnoteniach (2) (3) (4) (5) so stabilnými dávkami dostatočne odlíšenými, aby umožnili zatriedenie látky na klasifikačné účely a posúdenie nebezpečenstva. Metóda, ktorá bola prijatá v roku 1996, bola rozsiahlo validovaná pokusmi *in vivo* v porovnaní s údajmi LD_{50} získanými z literatúry, tak na národnej (6), ako aj na medzinárodnej úrovni (7).

Usmernenie pre výber najvhodnejšej testovacej metódy na daný účel možno nájsť v Usmerňujúcom dokumente o testovaní akútnej orálnej toxicity [Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (8)]. Tento usmerňujúci dokument obsahuje aj doplňujúce informácie o vykonávaní a interpretácii testovacej metódy B.1b.

Nie je potrebné podávať testované látky pri dávkach, o ktorých je známe, že spôsobujú silnú bolesť a utrpenie následkom leptavých alebo silne dráždivých účinkov. Moribundné zvieratá alebo zvieratá s bolesťami, alebo zvieratá, ktoré vykazujú príznaky silného a trvalého utrpenia, sa humánnym spôsobom usmrcujú a pri interpretácii výsledkov testu sa vyhodnocujú rovnako ako zvieratá, ktoré uhynuli pri teste. Kritériá na rozhodnutie usmrtiť moribundné alebo silne trpiace zvieratá a usmernenie o uznaní predvídateľnej alebo nastávajúcej smrti sú predmetom samostatného usmerňovacieho dokumentu (9).

Metóda využíva vopred stanovené dávky a výsledky umožňujú, aby sa látka mohla zatriediť a klasifikovať podľa Globálne harmonizovaného systému pre klasifikáciu chemikálií, ktoré spôsobujú akútnu toxicitu (10).

Metóda nie je v zásade určená na umožnenie výpočtu presnej hodnoty LD_{50}, ale umožňuje stanoviť definované rozsahy expozície, kde sa očakáva letalita, keďže uhynutie časti zvierat je stále najdôležitejším konečným bodom tohto testu. Metóda umožňuje stanoviť hodnoty LD_{50} iba v prípade, keď v dôsledku podania aspoň dvoch dávok je mortalita vyššia ako 0 % a nižšia ako 100 %. Výber vopred stanovených dávok bez ohľadu na testovanú látku s klasifikáciou výlučne viazanou na počet zvierat vyšetrovaných v rôznych stavoch zlepšuje možnosti konzistencie podávania správ a reprodukovateľnosti medzi laboratóriami.

▼B

Testovacie laboratórium posúdi všetky dostupné informácie o testovanej látke pred uskutočnením štúdie. Takéto informácie budú zahŕňať identitu a chemickú štruktúru látky, jej fyzikálno-chemické vlastnosti, výsledok všetkých ostatných *in vivo* alebo *in vitro* testov toxicity s látkou, toxikologické údaje o štrukturálne príbuzných látkach a predpokladané použitie(-ia) látky. Tieto informácie sú potrebné na ubezpečenie všetkých zainteresovaných, že test je dôležitý na ochranu zdravia ľudí a pomôže pri výbere najvhodnejšej počiatočnej dávky.

1.2. DEFINÍCIE

Akútna orálna toxicita: vzťahuje sa na tie nepriaznivé účinky, ktoré sa vyskytnú po orálnom podaní jednorazovej dávky látky alebo viacnásobných dávok podávaných v priebehu 24 hodín.

Oneskorená smrť: znamená, že zviera neuhynie ani sa nejaví ako moribundné v priebehu 48 hodín, ale uhynie neskôr v priebehu vymedzeného 14-dňového obdobia pozorovania.

Dávka: množstvo podanej testovanej látky. Dávka je vyjadrená ako hmotnosť testovanej látky na jednotku hmotnosti pokusného zvieraťa (napr. mg/kg).

GHS: Globálne harmonizovaný klasifikačný systém pre chemické látky a zmesi. Spoločný projekt OECD (zdravie ľudí a životné prostredie), Výboru expertov OSN pre prepravu nebezpečného tovaru (fyzikálno-chemické vlastnosti) a ILO (oznamovanie nebezpečenstva) a koordinovaný v rámci Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC).

Blížiaca sa smrť: keď sa očakáva moribundný stav pred ďalším plánovaným obdobím pozorovania. Príznaky, ktoré sú príznačné pre tento stav u hlodavcov by mohli zahŕňať kŕče, polohu na boku, polohu v ľahu a triašku. [Ďalšie informácie sa nachádzajú v Humane Endpoint Guidance Document (9).]

LD_{50} (stredná smrteľná orálna dávka): štatistický odvodená jednorazová dávka látky, pri ktorej sa dá očakávať, že spôsobí úhyn 50 % zvierat pri orálnom podaní. Hodnota LD_{50} je vyjadrená ako hmotnosť testovanej látky na jednotku hmotnosti pokusného zvieraťa (mg/kg).

Limitná dávka: sa vzťahuje na dávku nad hornou hranicou testovania (2 000 alebo 5 000 mg/kg).

Moribundný stav: stav umierania alebo neschopnosti prežiť, dokonca aj pri liečbe. [Ďalšie informácie sa nachádzajú v Humane Endpoint Guidance Document (9).]

Predvídateľná smrť: prítomnosť klinických príznakov charakteristických pre smrť v známom čase v budúcnosti pred plánovaným ukončením experimentu; napríklad neschopnosť prijímať vodu alebo jedlo. [Ďalšie informácie sa nachádzajú v Humane Endpoint Guidance Document (9).]

▼B

1.3. PRINCÍP TESTU

Princíp testu spočíva v tom, že na základe metódy postupných krokov s použitím minimálneho počtu zvierat na krok sa získajú dostatočné informácie o akútnej toxicite testovanej látky, ktoré umožnia jej klasifikáciu. Látka sa podáva orálne skupine pokusných zvierat v jednej zo stanovených dávok. Látka sa testuje s použitím metódy postupných krokov, v každom kroku sa použijú tri zvieratá rovnakého pohlavia (zvyčajne samice). Absencia alebo výskyt mortality súvisiacej s látkou u zvierat, ktorým sa podala dávka v jednom kroku, určí ďalší krok, t. j.:

— nie je potrebné ďalšie testovanie,

— podanie rovnakej dávky trom ďalším zvieratám,

— podanie najbližšej vyššej alebo najbližšej nižšej dávky trom ďalším zvieratám.

Informácie o postupe testu sú uvedené v prílohe 1. Metóda umožní posúdenie vzhľadom na klasifikáciu testovanej látky do jednej z viacerých tried toxicity definovaných pevnými hraničnými hodnotami LD_{50}.

1.4. OPIS METÓDY

1.4.1. **Výber druhu zvierat**

Spomedzi druhov hlodavcov sa prednostne používa potkan, hoci sa môže použiť aj iný druh hlodavca. Zvyčajne sa používajú samice (9). Je to preto, že prehľady konvenčných LD_{50} testov, uverejnené v odbornej literatúre, uvádzajú, že hoci je malý rozdiel v citlivosti medzi pohlaviami, v tých prípadoch, keď sa pozorovali rozdiely, sú samice zvyčajne mierne citlivejšie (11). Ak však z poznatkov o toxikologických alebo toxikokinetických vlastnostiach štrukturálne príbuzných chemikálií vyplýva, že samce môžu byť citlivejšie, potom sa použije toto pohlavie. Ak sa test uskutočňuje na samcoch, je potrebné uviesť primerané zdôvodnenie.

Používajú sa zdravé mladé dospelé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Samice majú byť panenské a negravidné. Každé zviera na začiatku dávkovania má byť vo veku od 8 do 12 týždňov a jeho hmotnosť má byť v rozpätí ± 20 % priemernej hmotnosti všetkých zvierat, ktorým sa predtým podala dávka.

1.4.2. **Podmienky umiestnenia a kŕmenia**

Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C (± 3 °C). Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 % a nemala by prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti by mala dosahovať 50 % – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé, v rytme 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Zvieratá môžu byť v klietkach po skupinách podľa dávok, ale počet zvierat na klietku musí umožniť zreteľné pozorovanie každého zvieraťa.

▼B

1.4.3. **Príprava zvierat**

Zvieratá sú náhodne vybrané, označené tak, aby sa umožnila jednotlivá identifikácia, a držia sa v klietkach aspoň 5 dní pred začiatkom podávania dávok, aby sa aklimatizovali na laboratórne podmienky.

1.4.4. **Príprava dávok**

Testované látky sa zvyčajne podávajú v stálom objeme počas celého intervalu dávkovania, ktoré sa má testovať na základe zmeny koncentrácie dávkovaného prípravku. Ak sa však má testovať kvapalný konečný produkt alebo zmes, použitie neriedenej testovanej látky, t. j. s konštantnou koncentráciou, môže byť pre následné stanovenie rizika tejto látky vhodnejšie a požadujú ho niektoré regulačné orgány. V každom prípade sa nesmie prekročiť maximálny objem podávanej dávky. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. U hlodavcov by objem zvyčajne nemal presiahnuť 1 ml/100 g telesnej hmotnosti: v prípade vodných roztokov sa však môže uvažovať o 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Pokiaľ ide o zloženie dávkovaného prípravku, odporúča sa vždy, keď je to možné, použitie vodného roztoku/suspenzie/emulzie, za ktorým v poradí nasleduje roztok/suspenzia/emulzia v oleji (napr. kukuričný olej), a potom prípadne roztok v iných nosičoch. Pre nosiče, ktoré sú iné ako voda, by mali byť známe toxikologické charakteristiky. Dávky musia byť pripravené tesne pred podávaním, pokiaľ nie je známa a prijateľná stabilita prípravku počas obdobia, keď sa bude používať.

1.5. POSTUP

1.5.1. **Podávanie dávok**

Testovaná látka sa podáva ako jednorazová dávka cez sondu s použitím žalúdočnej sondy alebo vhodnej intubačnej kanyly. Za nezvyčajných okolností, keď nie je možná jednorazová dávka, sa môže dávka podávať v menších množstvách v priebehu maximálne 24 hodín.

Zvieratá sa pred podávaním dávok vyhladujú (napr. potkanom sa cez noc zadrží potrava, ale nie voda; myšiam sa na 3 – 4 hodiny zadrží potrava, ale nie voda). Po období hladovania sa zvieratá odvážia a podá sa im testovaná látka. Po podaní látky sa zadrží potrava na ďalšie 3 – 4 hodiny potkanom alebo myšiam na 1 – 2 hodiny. Ak sa dávka podáva po častiach počas určitého obdobia, môže byť potrebné poskytnúť zvieratám potravu a vodu v závislosti od dĺžky obdobia.

1.5.2. **Počet zvierat a veľkosť dávok**

Na každý krok sa použijú tri zvieratá. Veľkosť dávky, ktorá sa použije ako počiatočná dávka, sa vyberie z jednej zo štyroch stabilných hodnôt 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti. Počiatočná dávka má byť taká, pri ktorej s najväčšou pravdepodobnosťou nastane smrť u niektorých zvierat, ktorým sa dávka podala. Postupové diagramy v prílohe 1 opisujú postup, ktorý je potrebné dodržiavať pre každú z počiatočných dávok. Pritom príloha 4 poskytuje usmernenie ku klasifikácii v schéme EÚ, až kým sa nezavedie nový GHS.

▼B

Keď z dostupných informácií vyplýva, že úmrtie je nepravdepodobné pri najvyššej počiatočnej dávke (2 000 mg/kg telesnej hmotnosti), potom je potrebné vykonať limitný test. Ak nie sú žiadne informácie o látke, ktorá sa má testovať, z dôvodu starostlivosti o zvieratá sa odporúča použiť počiatočnú dávku 300 mg/kg telesnej hmotnosti.

Časový interval medzi skupinami dávok je určený nástupom, trvaním a závažnosťou príznakov toxicity. Zvieratám sa podá ďalšia dávka až po ubezpečení, že zvieratá, ktorým sa predtým dávka podala, prežili.

Výnimočne, a iba v odôvodnených prípadoch na základe osobitných regulačných potrieb, sa môže uvažovať o použití ďalšej vyššej stabilnej dávky 5 000 mg/kg telesnej hmotnosti (pozri prílohu 2). Z dôvodu starostlivosti o zvieratá sa testy na zvieratách v rozsahu GHS kategórie 5 (2 000 – 5 000 mg/kg) neodporúčajú a uvažuje sa o nich iba v prípade veľkej pravdepodobnosti, že výsledky takéhoto testu by mohli byť bezprostredne dôležité pre ochranu zdravia ľudí a zvierat alebo ochranu životného prostredia.

1.5.3. **Limitný test**

Limitný test sa používa predovšetkým v situáciách, keď experimentátor má informácie, z ktorých vyplýva, že testovaný materiál je pravdepodobne netoxický, t. j. že je toxický iba v prípade, keď prevyšuje predpismi stanovené limitné dávky. Informácie o toxicite testovaného materiálu možno získať z poznatkov o podobných testovaných látkach alebo podobne testovaných zmesiach alebo produktoch pri zohľadnení identity a percenta zložiek, o ktorých je známe, že sú toxikologicky významné. V týchto situáciách, keď existuje málo informácií alebo neexistujú žiadne informácie o jeho toxicite, alebo v ktorých sa očakáva, že testovaný materiál bude toxický, je potrebné vykonať základný test.

Limitný test s jednou dávkou 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti sa môže vykonať so šiestimi zvieratami (tri zvieratá na každý krok). Výnimočne sa môže vykonať limitný test s jednou dávkou 5 000 mg/kg s tromi zvieratami (pozri prílohu 2). Ak sa vyskytne uhynutie súvisiace s testovanou látkou, môže byť potrebné vykonať ďalšie testovanie s najbližšou nižšou dávkou.

1.6. POZOROVANIA

Zvieratá sa pozorujú individuálne po podaní dávky aspoň raz počas prvých 30 minút, pravidelne počas prvých 24 hodín, osobitne pozorne počas prvých 4 hodín a potom každý deň počas celkove 14 dní okrem prípadu, keď je potrebné zvieratá vylúčiť zo štúdie a z dôvodu starostlivosti o zvieratá humánnym spôsobom usmrtiť alebo keď sa zistí, že uhynuli. Dĺžka pozorovania by sa však nemala pevne stanoviť. Stanoví sa na základe toxických reakcií, času nástupu a dĺžky času zotavenia, a teda sa môže predĺžiť, ak sa to pokladá za potrebné. Časy, keď sa objavia a zmiznú príznaky toxicity, sú dôležité predovšetkým v prípade tendencie oneskorenia toxických príznakov (12). Všetky pozorovania sa systematicky zaznamenávajú, pričom každé zviera má individuálny záznam.

▼B

Ďalšie pozorovania budú potrebné, ak zvieratá naďalej vykazujú príznaky toxicity. Pri vyšetreniach sa venuje pozornosť zmenám na pokožke a srsti, očiach a slizniciach a tiež respiračnému, obehovému, autonómnemu a centrálnemu nervovému systému a somatomotorickej aktivite a spôsobu správania. Pozornosť sa zameriava na pozorovanie triašky, kŕčov, slinenia, hnačky, letargie, spánku a kómy. Zohľadňujú sa aj zásady a kritériá zosumarizované v Humane Endpoints Guidance Document (9). Zvieratá, ktoré sú v moribundnom stave alebo vykazujú silné bolesti alebo pretrvávajúce príznaky silného utrpenia, sa humánnym spôsobom usmrtia. Keď sa zvieratá usmrtia z humánnych dôvodov alebo sa nájdu uhynuté, je potrebné čo možno najpresnejšie zaznamenať čas uhynutia.

1.6.1. **Telesná hmotnosť**

Hmotnosť jednotlivých zvierat sa stanovuje krátko pred podaním testovanej látky a potom aspoň každý týždeň. Zmeny hmotnosti sa vypočítajú a zaznamenajú. Na konci testu sa zvieratá, ktoré prežili, odvážia a humánnym spôsobom usmrtia.

1.6.2. **Patológia**

Všetky testované zvieratá (vrátane tých, ktoré uhynú počas testu alebo sú vylúčené zo štúdie z dôvodu starostlivosti o zvieratá) sa podrobujú autopsii. Všetky makroskopické patologické zmeny u každého zvieraťa sa zaznamenávajú. Môže sa tiež uvažovať o vykonaní mikroskopického vyšetrenia orgánov, dokazujúceho makropatologické nálezy vo zvieratách, ktoré prežili 24 alebo viac hodín, ktoré môže poskytnúť užitočné informácie.

2. **ÚDAJE**

O jednotlivých zvieratách sa uvádzajú informácie. Okrem toho sa všetky údaje zhrnú v podobe tabuliek, kde sa uvedie pre každú pokusnú skupinu počet použitých zvierat, počet zvierat vykazujúcich príznaky toxicity, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu alebo ich usmrtili z humánnych dôvodov, čas uhynutia jednotlivých zvierat, opis a časový priebeh toxických účinkov a reverzibility a pitevné nálezy.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

3.1. **Správa o teste**

Správa o teste musí podľa potreby obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter, čistota a v prípade potreby fyzikálnochemické vlastnosti (vrátane izomerizácie),

— identifikačné údaje vrátane čísla CAS.

Nosič (v prípade potreby):

— zdôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda.

Pokusné zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

▼B

— mikrobiologický stav zvierat, ak je známy,

— počet, vek a pohlavie zvierat (vrátane zdôvodnenia na použitie samcov namiesto samíc, ak je potrebné),

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

Testovacie podmienky:

— údaje o zložení testovanej látky vrátane údajov o fyzikálnej forme podávaného materiálu,

— údaje o podávaní testovanej látky vrátane objemov dávok a čase podávania,

— údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu krmiva/zdroja, zdroja vody),

— zdôvodnenie výberu počiatočnej dávky.

Výsledky:

— tabuľkové spracovanie získaných údajov o reakcii a veľkosti dávky pre každé zviera (t. j. zvieratá vykazujúce príznaky toxicity vrátane mortality, charakteru, závažnosti a trvania účinkov),

— tabuľkové spracovanie telesnej hmotnosti a zmien telesnej hmotnosti,

— hmotnosti jednotlivých zvierat v deň podávania dávok, potom v týždňových intervaloch a v čase uhynutia alebo usmrtenia,

— dátum a čas uhynutia v prípade vopred naplánovaného usmrtenia,

— časový priebeh nástupu príznakov toxicity a či tieto príznaky boli reverzibilné pre každé zviera,

— pitevné nálezy a histopatologické nálezy pre každé zviera, ak sú k dispozícii.

Diskusia a interpretácia výsledkov.

Závery.

4. **ODKAZY**

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. and Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86.

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336 – 341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559 – 610.

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729 – 734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, 129 – 134.

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method – An Alternative to the LD50 Test. Arch. Toxicol. 66, 455 – 470.

▼B

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659 – 670.

(8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

(10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://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, 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

Príloha 1

POSTUP, KTORÝ JE POTREBNÉ DODRŽIAVAŤ PRE KAŽDÚ POČIATOČNÚ DÁVKU

VŠEOBECNÉ POZNÁMKY

Pre každú počiatočnú dávku príslušné testovacie schémy, ako je uvedené v tejto prílohe, uvádzajú postup, ktorý je potrebné dodržiavať.

— príloha 1 A: počiatočná dávka je 5 mg/kg telesnej hmotnosti,

— príloha 1 B: počiatočná dávka je 50 mg/kg telesnej hmotnosti,

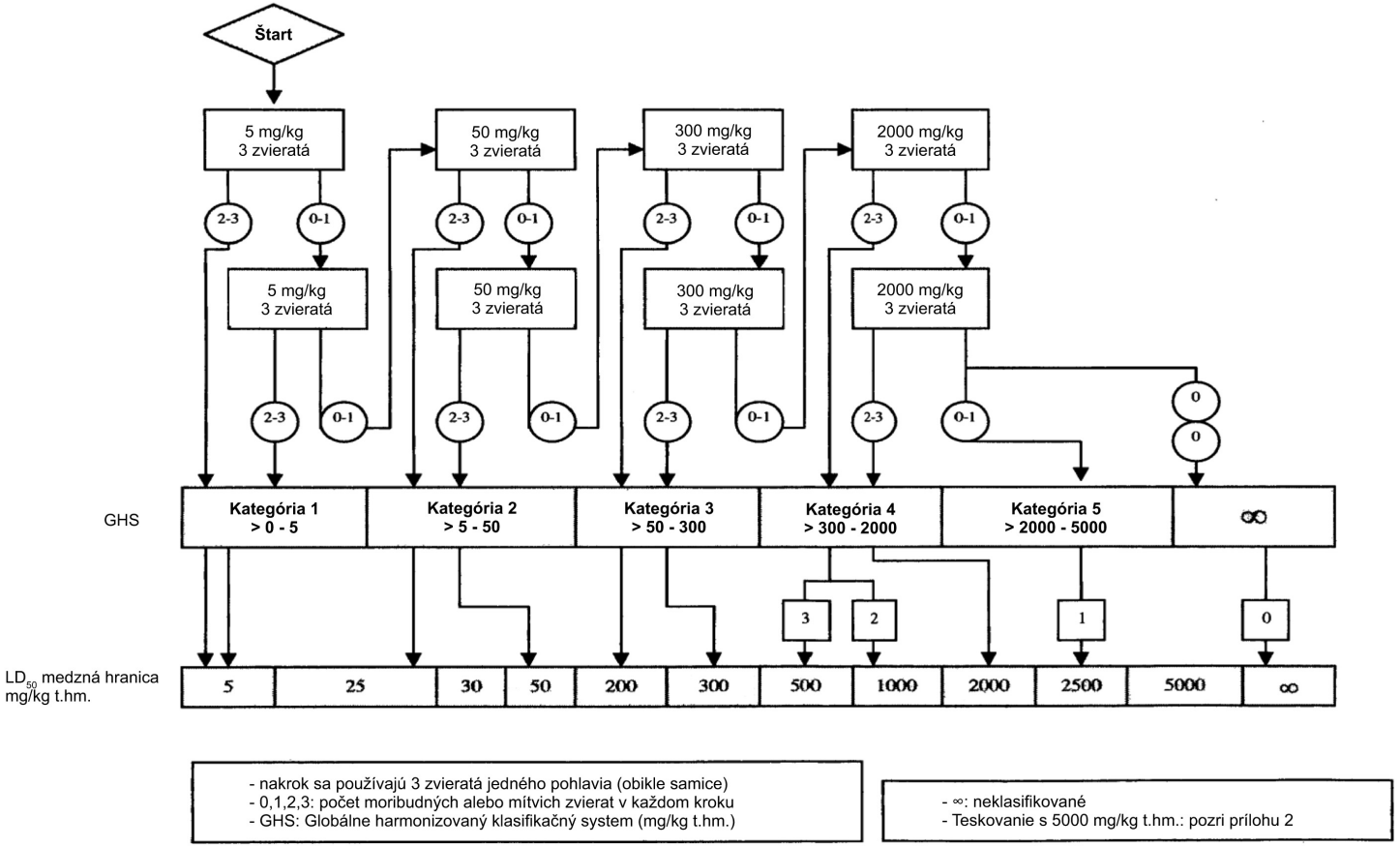
— príloha 1 C: počiatočná dávka je: 300 mg/kg telesnej hmotnosti,

— príloha 1 D: počiatočná dávka je: 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti.

V závislosti od počtu zvierat usmrtených humánnym spôsobom alebo uhynutých sa postup testovania uskutočňuje podľa naznačených šípok.

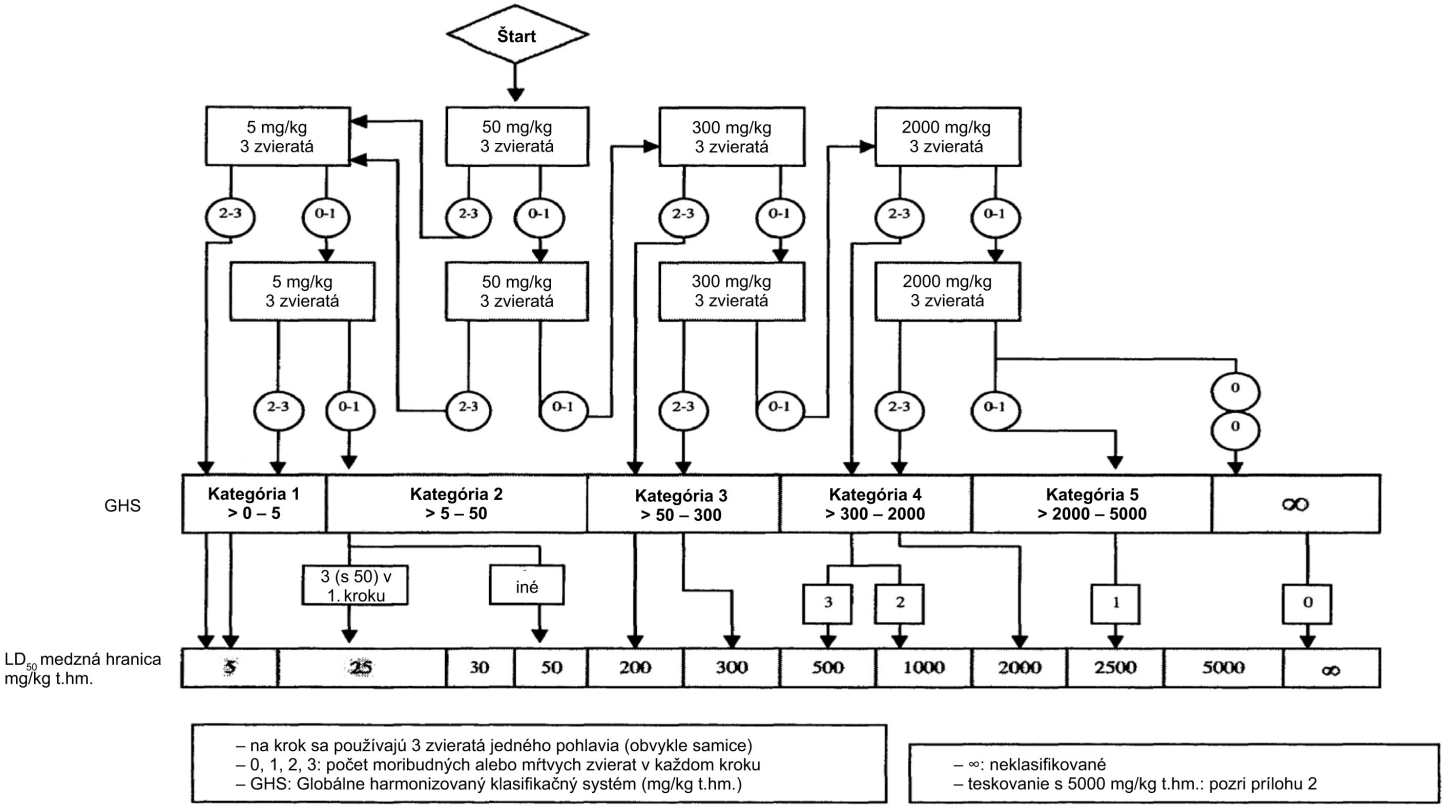
Príloha 1 A

POSTUP TESTOVANIA S POČIATOČNOU DÁVKOU 5 MG/KG TELESNEJ HMOTNOSTI



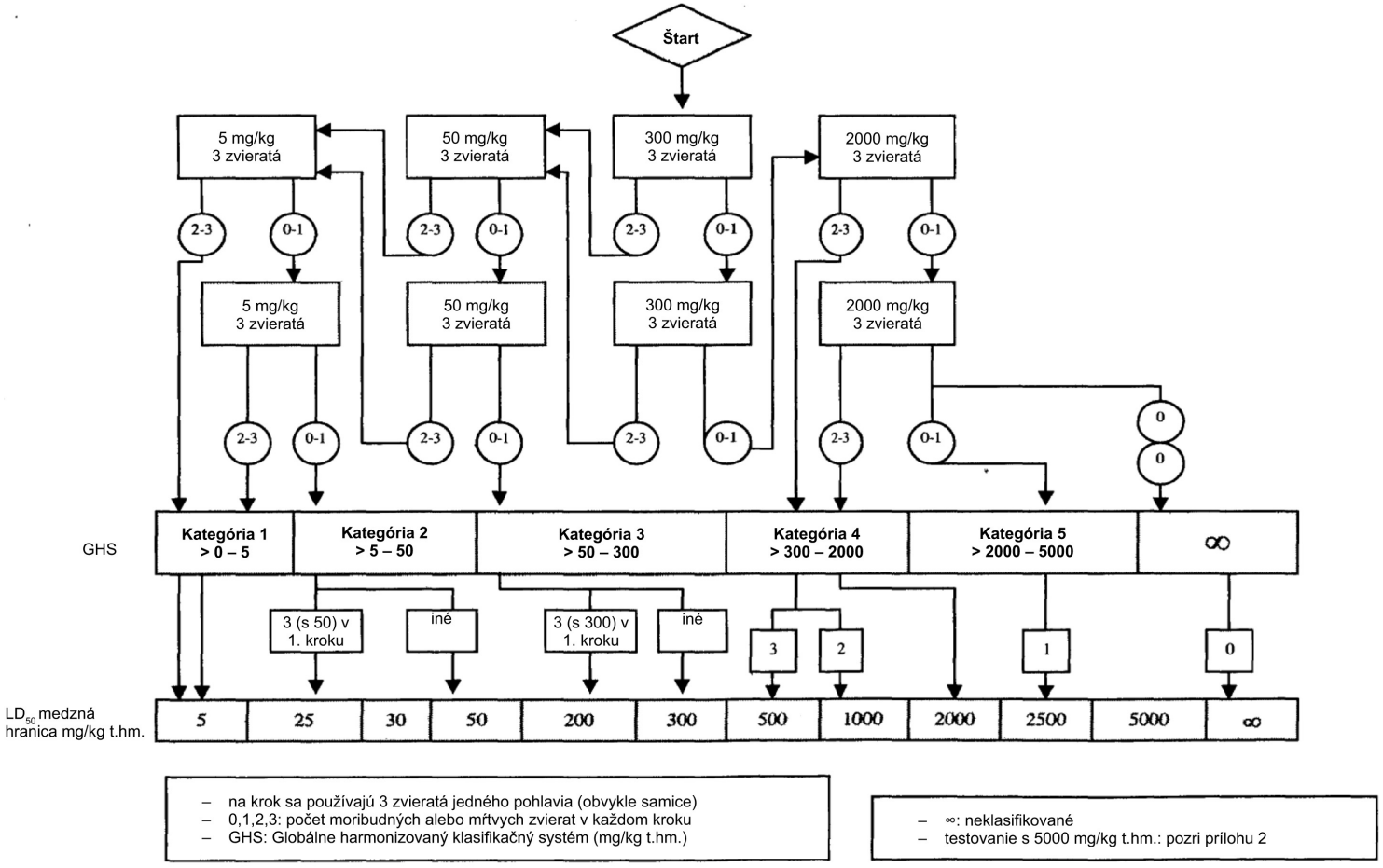
Príloha 1 B

POSTUP TESTOVANIA S POČIATOČNOU DÁVKOU 50 MG/KG TELESNEJ HMOTNOSTI



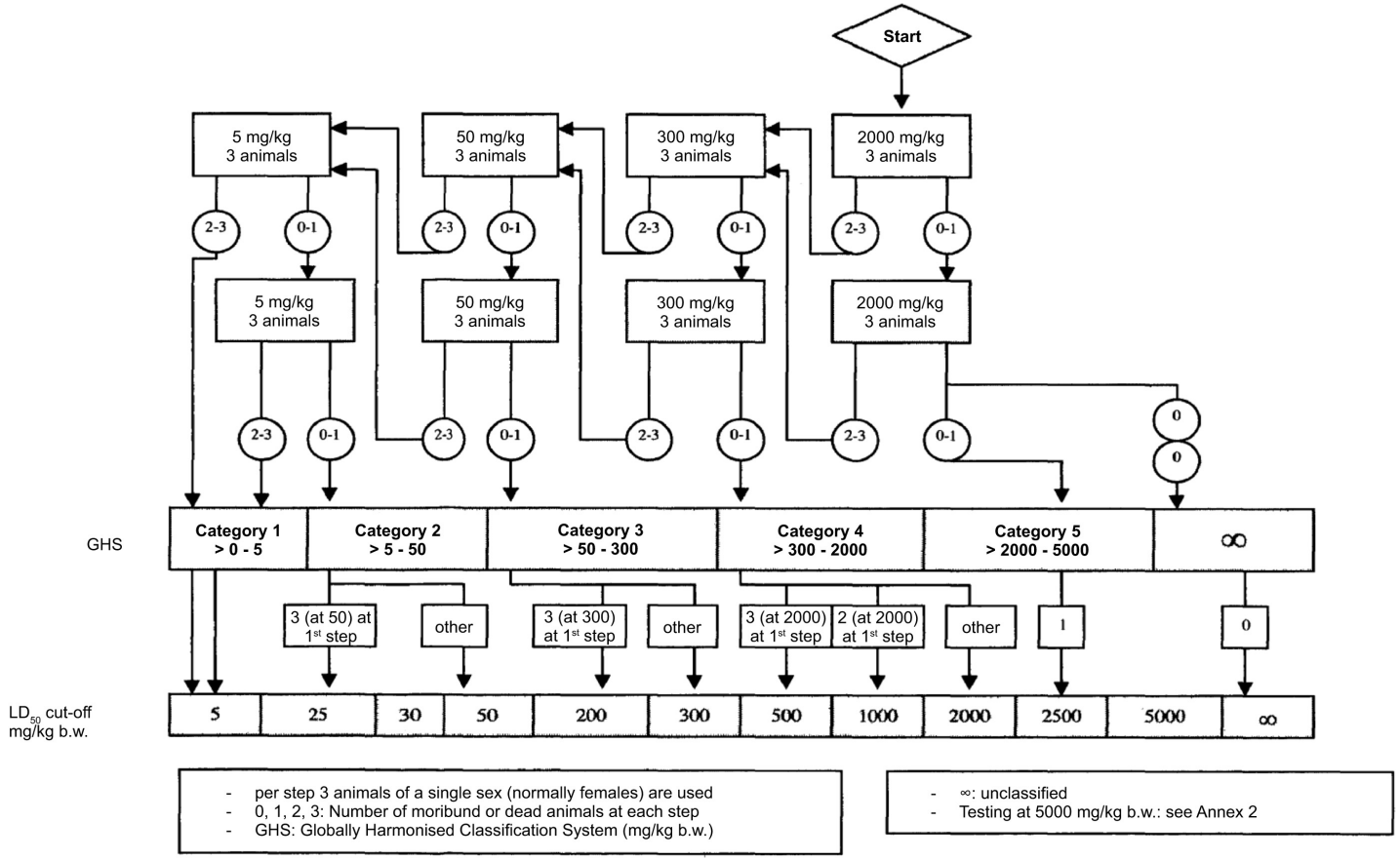
Príloha 1 C

POSTUP TESTOVANIA S POČIATOČNOU DÁVKOU 300 MG/KG TELESNEJ HMOTNOSTI



Príloha 1 D

POSTUP TESTOVANIA S POČIATOČNOU DÁVKOU 2 000 MG/KG TELESNEJ HMOTNOSTI



▼B

Príloha 2

KRITÉRIÁ PRE KLASIFIKÁCIU TESTOVANÝCH LÁTOK S OČAKÁVANÝMI HODNOTAMI LD_{50} VYŠŠÍMI AKO 2 000 MG/KG, KTORÉ NIE JE POTREBNÉ TESTOVAŤ

Kritériá pre kategóriu nebezpečenstva 5 sú určené na to, aby sa umožnila identifikácia testovaných látok s relatívne nízkym nebezpečenstvom akútnej toxicity, ale ktoré za určitých podmienok môžu predstavovať nebezpečenstvo pre zraniteľnejšie skupiny obyvateľstva. Predpokladá sa, že tieto látky majú orálnu alebo dermálnu LD_{50} v rozsahu 2 000 – 5 000 mg/kg alebo rovnocennú s dávkami pre iné cesty podávania. Testované látky sa klasifikujú do kategórie nebezpečenstva, ktorá je definovaná ako: 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (kategória 5 v GHS) v týchto prípadoch:

a) ak sú zaradené do tejto kategórie na základe niektorej z testovacích schém v prílohe 1a – 1d založených na prípadoch úmrtia;

b) ak je už dostupný spoľahlivý dôkaz, z ktorého vyplýva, že LD_{50} je v rozsahu hodnôt kategórie 5; alebo z iných štúdií na zvieratách alebo toxických účinkoch u ľudí vyplývajú akútne dôsledky pre zdravie ľudí.

c) pomocou extrapolácie, odhadu a merania údajov, ak nie je potvrdené zaradenie do vyššej triedy nebezpečenstva, a

   — sú k dispozícii dostupné spoľahlivé informácie, z ktorých vyplývajú závažné toxické účinky u ľudí, alebo

   — vyskytla sa mortalita pri testovaní s orálnym podávaním dávok až do hodnôt kategórie 4, alebo

   — ak odborné posúdenie potvrdí závažné klinické príznaky toxicity pri testovaní až do hodnôt kategórie 4, okrem hnačky, zježenia alebo neupraveného vzhľadu, alebo

   — ak odborné posúdenie potvrdí spoľahlivé informácie, z ktorých vyplývajú na základe iných štúdií na zvieratách možné závažné akútne účinky.

TESTOVANIE S DÁVKAMI NAD 2 000 MG/KG

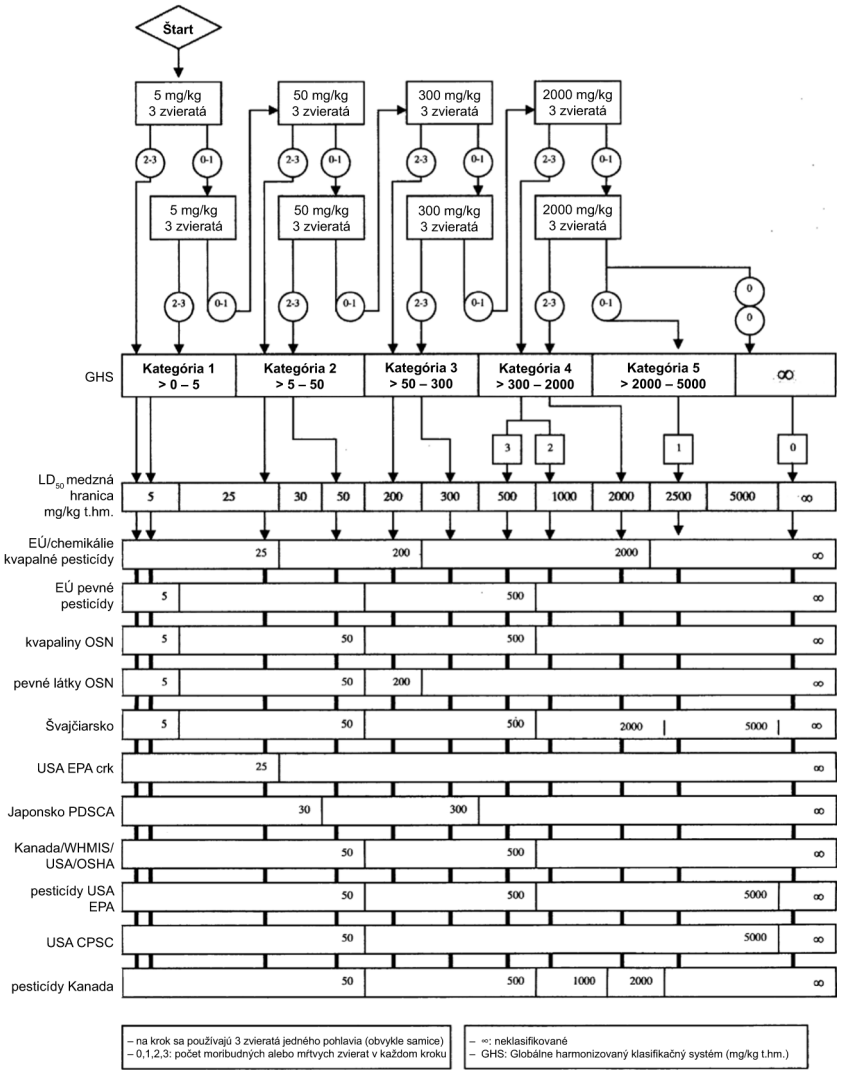
Vzhľadom na potrebu ochrany zvierat sa testovanie zvierat v rozsahoch kategórie 5 (5 000 mg/kg) neodporúča a môže sa o jeho použití uvažovať iba v prípade veľkej pravdepodobnosti, že by výsledky takéhoto testu mohli byť bezprostredne dôležité pre ochranu zdravia ľudí a zvierat (10). Nie je potrebné uskutočniť ďalšie testovanie s vyššími dávkami.

Ak sa pre testovanie vyžaduje dávka 5 000 mg/kg, je potrebný iba jeden krok (t. j. tri zvieratá). Ak zviera, ktorému sa najskôr podala dávka, uhynie, potom podávanie dávok pokračuje s dávkou 2 000 mg/kg v súlade s postupovými diagramami v prílohe 1. Ak prvé zviera prežije, dvom ďalším sa podajú dávky. Ak uhynie iba jedno z troch zvierat, očakáva sa, že hodnota LD_{50} bude vyššia ako 5 000 mg/kg. Ak obe zvieratá uhynú, potom sa podajú dávky s veľkosťou 2 000 mg/kg.

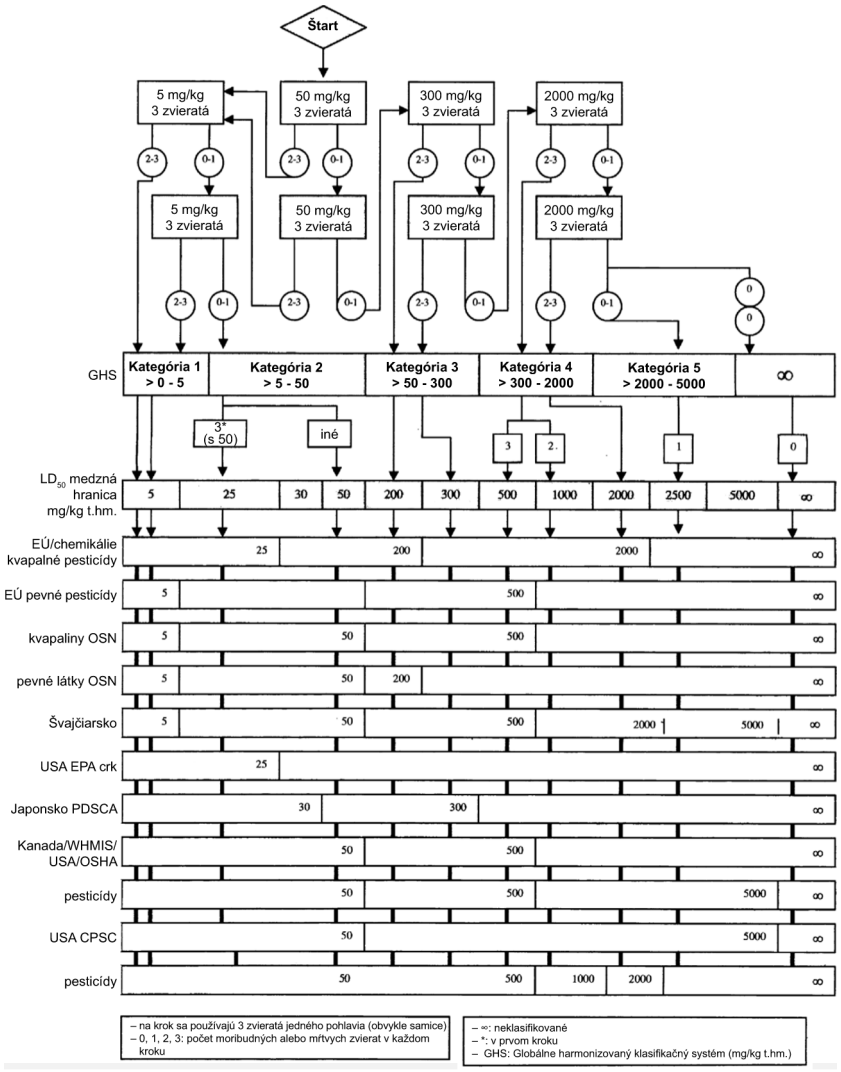
▼B

Príloha 3

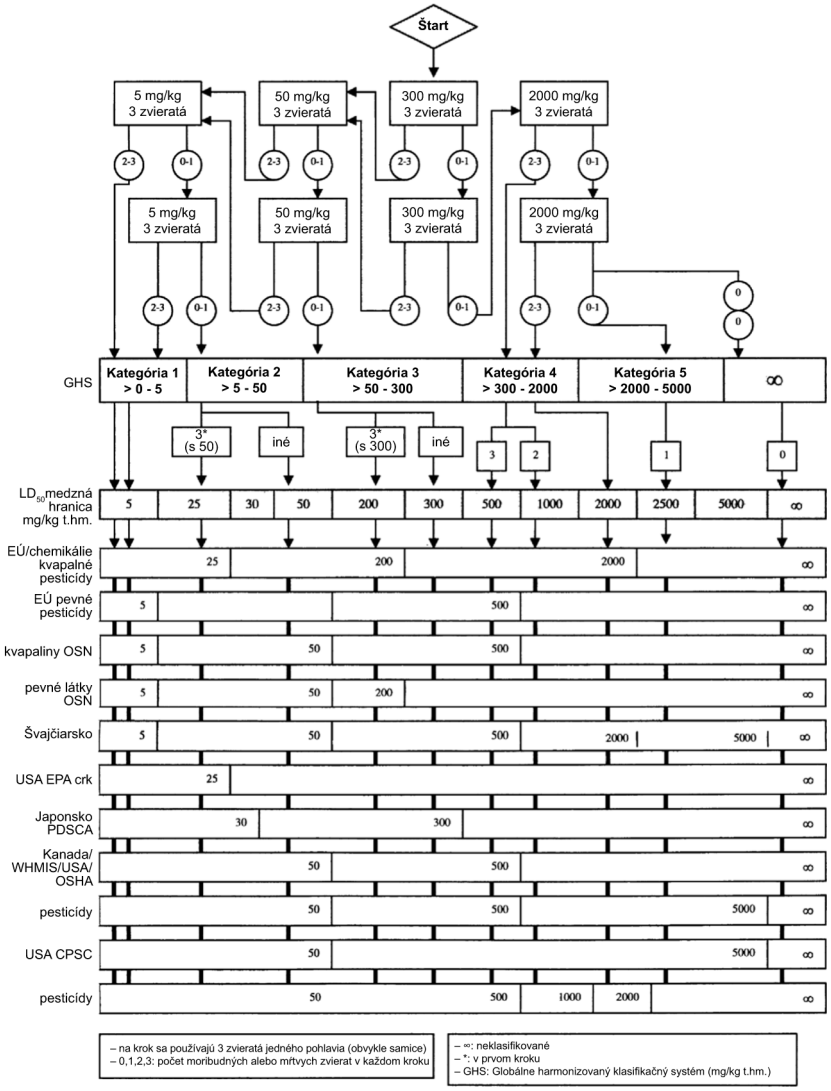
TESTOVACIA METÓDA B.1 tris: Usmernenie pre klasifikáciu podľa schémy EÚ na prekonanie prechodného obdobia až do úplného zavedenia Globálne harmonizovaného klasifikačného systém (GHS) [prevzaté z odkazu (8)]



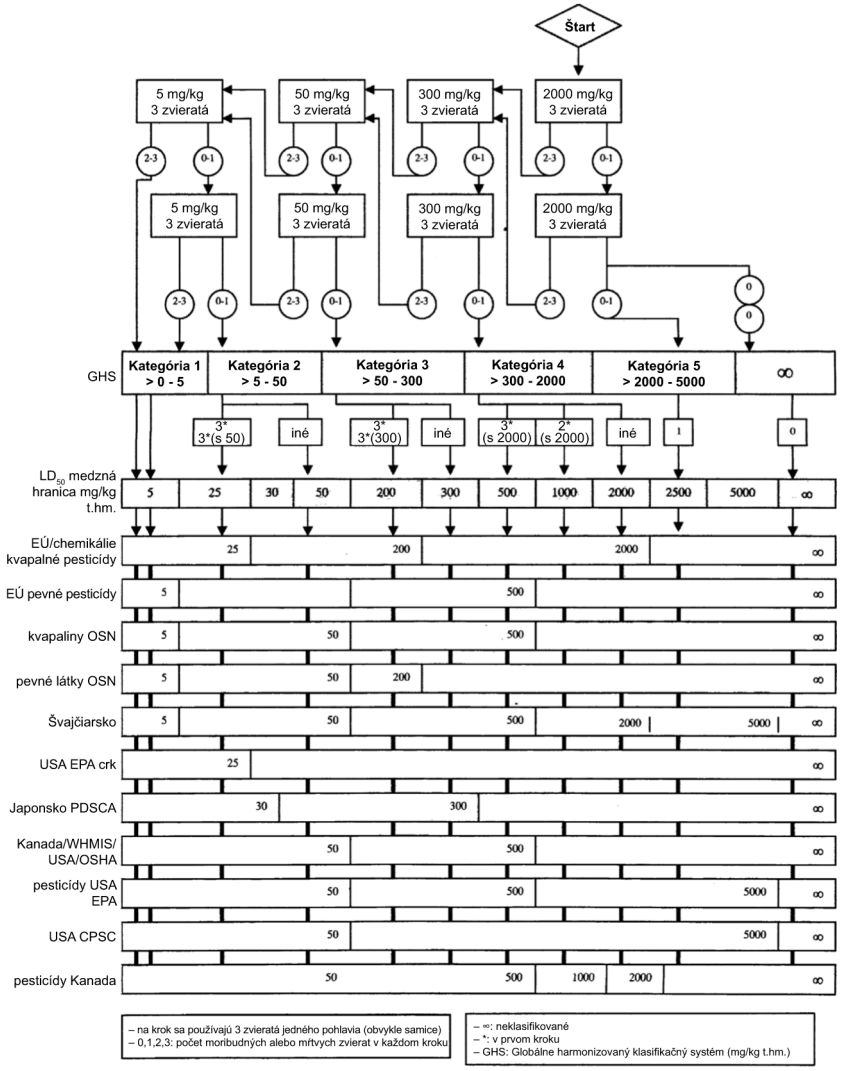
▼B


Štart
5 mg/kg 3 zvieratá
50 mg/kg 3 zvieratá
300 mg/kg 3 zvieratá
2000 mg/kg 3 zvieratá
2-3
0-1
0
GHS
Kategória 1 > 0 - 5
Kategória 2 > 5 - 50
Kategória 3 > 50 - 300
Kategória 4 > 300 - 2000
Kategória 5 > 2000 - 5000
∞
3* (s 50)
iné
LD50 medzná hranica mg/kg t.hm.
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
EÚ/chemikálie kvapalné pesticídy
EÚ pevné pesticídy
kvapaliny OSN
pevné látky OSN
Švajčiarsko
USA EPA crk
Japonsko PDSCA
Kanada/WHMIS/ USA/OSHA
pesticídy
USA CPSC
– na krok sa používajú 3 zvieratá jedného pohlavia (obvykle samice)
– 0, 1, 2, 3: počet moribudných alebo mŕtvych zvierat v každom kroku
– ∞: neklasifikované
– *: v prvom kroku
– GHS: Globálne harmonizovaný klasifikačný systém (mg/kg t.hm.)

▼B


Štart
5 mg/kg 3 zvieratá
50 mg/kg 3 zvieratá
300 mg/kg 3 zvieratá
2000 mg/kg 3 zvieratá
2-3
0-1
0
GHS
Kategória 1 > 0 - 5
Kategória 2 > 5 - 50
Kategória 3 > 50 - 300
Kategória 4 > 300 - 2000
Kategória 5 > 2000 - 5000
∞
3* (s 50)
iné
3* (s 300)
LD50 medzná hranica mg/kg t.hm.
EÚ/chemikálie kvapalné pesticídy
EÚ pevné pesticídy
kvapaliny OSN
pevné látky OSN
Švajčiarsko
USA EPA crk
Japonsko PDSCA
Kanada/ WHMIS/USA/ OSHA
pesticídy
USA CPSC
pesticídy
– na krok sa používajú 3 zvieratá jedného pohlavia (obvykle samice)
– 0,1,2,3: počet moribudných alebo mŕtvych zvierat v každom kroku
– ∞: neklasifikované
– *: v prvom kroku
– GHS: Globálne harmonizovaný klasifikačný systém (mg/kg t.hm.)

▼B


Štart
5 mg/kg 3 zvieratá
50 mg/kg 3 zvieratá
300 mg/kg 3 zvieratá
2000 mg/kg 3 zvieratá
2-3
0-1
0
GHS
Kategória 1 > 0 - 5
Kategória 2 > 5 - 50
Kategória 3 > 50 - 300
Kategória 4 > 300 - 2000
Kategória 5 > 2000 - 5000
∞
3* 3*(s 50)
iné
3* 3*(300)
3* (s 2000)
2* (s 2000)
1
LD50 medzná hranica mg/kg t.hm.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EÚ/chemikálie kvapalné pesticídy
EÚ pevné pesticídy
kvapaliny OSN
pevné látky OSN
Švajčiarsko
USA EPA crk
Japonsko PDSCA
Kanada/WHMIS/ USA/OSHA
pesticídy USA EPA
USA CPSC
pesticídy Kanada
– na krok sa používajú 3 zvieratá jedného pohlavia (obvykle samice)
– 0,1,2,3: počet moribudných alebo mŕtvych zvierat v každom kroku
– ∞: neklasifikované
– *: v prvom kroku
– GHS: Globálne harmonizovaný klasifikačný systém (mg/kg t.hm.)

▼M4

B.2. AKÚTNA INHALAČNÁ TOXICITA

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov TG 403 (2009) (1). Pôvodné Usmernenia na vykonávanie testov akútnej inhalácie 403 (TG 403) boli prijaté v roku 1981. Táto revidovaná testovacia metóda B.2 (ako rovnocenná verzia revidovaných usmernení TG 403) bola vytvorená s cieľom zabezpečiť väčšiu flexibilitu, znížiť využívanie zvierat a vyhovieť regulačným potrebám. Revidovaná testovacia metóda zahŕňa dva druhy štúdií: tradičný protokol LC_{50} a protokol koncentrácia × čas (C × t). Základnými črtami tejto testovacej metódy sú schopnosť určiť závislosť koncentrácie a reakcie v rozsahu od neletálnych dôsledkov až po smrteľné dôsledky na účely odvodenia strednej smrteľnej koncentrácie (LC_{50}), neletálnej prahovej koncentrácie (napr. LC01) a sklonu a zistenia potenciálnej vnímavosti pohlaví. Protokol C × t by sa mal použiť v prípade, že existuje konkrétna regulačná alebo vedecká potreba, ktorá vyžaduje testovanie na zvieratách v priebehu viacerých časových intervalov, ako napríklad na účely plánovania núdzovej reakcie [napr. odvodenie hodnôt smerodajných úrovní akútnej expozície (AEGL), usmernení pre plánovanie núdzovej reakcie (ERPG) alebo prahových úrovní akútnej expozície (AETL)] alebo na plánovanie využitia krajiny.

2. Usmernenia k vykonaniu a interpretácii štúdií tejto testovacej metódy sú k dispozícii v usmerňovacom dokumente o testovaní akútnej inhalačnej toxicity (GD 39) (2).

3. Vymedzenie pojmov použitých v súvislosti s touto testovacou metódou je uvedené na konci tejto kapitoly a v dokumente GD 39 (2).

4. Táto testovacia metóda umožňuje charakterizáciu testovanej chemikálie a kvantitatívne posúdenie rizík a umožňuje, aby boli testované chemikálie zoradené a klasifikované podľa nariadenia (ES) č. 1272/2008 (3). V dokumente GD 39 (2) sa uvádzajú usmernenia k výberu vhodnej metódy testovania akútnej toxicity. Ak sa požadujú iba informácie o klasifikácii a označovaní, vo všeobecnosti sa odporúča riadiť sa kapitolou B.52 tejto prílohy (4) [pozri dokument GD 39 (2)]. Táto testovacia metóda B.2 nie je špecificky určená na testovanie špecializovaných materiálov, ako sú slabo rozpustné izometrické alebo vláknité materiály alebo priemyselne vyrábané nanomateriály.

ÚVODNÉ ÚVAHY

5. Pred zvažovaním testovania podľa tejto testovacej metódy by testovacie laboratórium malo zohľadniť všetky dostupné informácie o testovanej chemikálii vrátane existujúcich štúdií [napr. kapitola B.52 tejto prílohy (4)] obsahujúcich údaje, na základe ktorých sa ďalšie testovanie neodporúča s cieľom minimalizovať využívanie zvierat. Informácie, ktoré môžu pomôcť pri výbere najvhodnejšieho druhu, kmeňa, pohlavia, spôsobu expozície a primeraných testovacích koncentrácií, zahŕňajú identitu, chemickú štruktúru a fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie, výsledky všetkých testov toxicity *in vitro* alebo *in vivo*, predpokladané použitia a potenciál expozície človeka, dostupné údaje (Q)SAR a toxikologické údaje o štrukturálne príbuzných látkach [pozri dokument GD 39 (2)].

▼M4

6. Testovaniu žieravých a/alebo dráždivých testovacích chemikálií v koncentráciách, ktoré podľa očakávania spôsobia silnú bolesť a/alebo utrpenie by sa malo v čo najväčšej možnej miere vyhnúť. Žieravý/dráždivý potenciál by sa mal posúdiť prostredníctvom odborného posudku s využitím takých dôkazov, ako sú skúseností u ľudí a pri zvieratách (napr. zo štúdií opakovaných dávok uskutočnených pri nežieravých/dráždivých koncentráciách), existujúce údaje *in vitro* [napr. z kapitol B.40, (5), B.40a (6) tejto prílohy alebo dokumentu OECD TG 435 (7)], hodnoty pH, informácie o podobných látkach alebo akékoľvek iné súvisiace údaje, s cieľom preskúmať, či je možné vyhnúť sa ďalšiemu testovaniu. Na špecifické regulačné účely (napr. na účely núdzového plánovania) možno túto testovaciu metódu použiť na expozíciu zvierat týmto materiálom, lebo to poskytne vedúcemu štúdie alebo vedúcemu výskumnému pracovníkovi kontrolu nad výberom cieľových koncentrácií. Cieľové koncentrácie by však nemali spôsobovať silné dráždivé/žieravé účinky, mali by však byť dostatočné na predĺženie krivky závislosti reakcie od koncentrácie na úroveň, na ktorej sa zabezpečí regulačný a vedecký cieľ testu. Tieto koncentrácie by sa mali vyberať v závislosti od jednotlivých prípadov a výber koncentrácie by sa mal odôvodniť [pozri dokument GD 39 (2)].

PRINCÍP TESTU

7. Táto revidovaná testovacia metóda B.2 bola vypracovaná s cieľom získať dostatočné informácie o akútnej toxicite testovanej chemikálie, aby bolo možné ju klasifikovať a aby sa získali údaje o letalite (napr. LC_{50}, LC_{01} a sklon) v prípade jedného alebo oboch pohlaví potrebné na kvantitatívne posúdenie rizík. V rámci tejto testovacej metódy sú k dispozícii dve metódy. Prvou metódou je tradičný protokol, pri ktorom sú skupiny zvierat vystavené limitnej koncentrácii (limitný test) alebo sérii koncentrácií v rámci postupu niekoľkých krokov väčšinou v intervaloch trvajúcich štyri hodiny, ktoré sa určia vopred. Na špecifické regulačné účely možno použiť iné intervaly expozície. Druhou metódou je protokol ($C \times t$), pri ktorom sú skupiny zvierat vystavené jednej koncentrácii (limitná koncentrácia) alebo sérii viacerých koncentrácií v priebehu viacerých intervalov.

8. Moribundné zvieratá alebo zvieratá so zjavnými bolesťami alebo zvieratá, ktoré vykazujú príznaky silného a trvalého utrpenia, by sa mali humánnym spôsobom usmrtiť, pričom pri interpretácii výsledku testu sa vyhodnocujú rovnako ako zvieratá, ktoré uhynuli pri teste. Kritériá na rozhodnutie usmrtiť moribundné alebo silne trpiace zvieratá a usmernenie o uznaní predvídateľnej alebo nastávajúcej smrti sú predmetom usmerňovacieho dokumentu OECD č. 19 o humánnych parametroch (Humane Endpoints Guidance Document) (8).

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

9. Používajú sa zdravé mladé dospelé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Najvhodnejším zvieraťom je potkan. Použitie iných druhov zvierat je nutné odôvodniť.

Príprava zvierat

10. Používajú sa samice, ktoré nikdy nevrhli mláďatá a sú negravidné. V deň expozície by zvieratá mali byť mladé dospelé jedince vo veku od 8 do 12 týždňov a ich telesná hmotnosť by mala byť v rozmedzí ± 20 % strednej hmotnosti jednotlivých pohlaví všetkých zvierat toho istého veku, ktoré boli exponované skôr. Zvieratá sa vyberajú náhodne a označia sa na účely individuálnej identifikácie. Zvieratá sa umiestnia do klietok najmenej na päť dní pred začatím testu, aby sa aklimatizovali na laboratórne podmienky. Zvieratá by sa na krátky čas pred testovaním mali aklimatizovať aj na testovacie zariadenie, lebo sa tak zníži stres spôsobený uvedením do nového prostredia.

▼M4

Chov zvierat

11. Teplota miestnosti, kde sa pokusné zviera chová, by mala byť 22 ± 3 °C. Relatívna vlhkosť by sa v ideálnom prípade mala udržiavať v rozsahu od 30 do 70 %, hoci to nemusí byť možné, ak sa ako nosič používa voda. Pred a po expozícii sú zvieratá zvyčajne umiestnené v klietkach v skupinách podľa pohlavia a koncentrácie, ale počet zvierat v jednej klietke by nemal prekážať bezproblémovému pozorovaniu každého zvieraťa, pričom by sa mali minimalizovať straty súvisiace so vzájomným požieraním alebo bojom jedincov. V prípade, že sa použije iba expozícia oblasti nosa, môže byť potrebné, aby sa zvieratá aklimatizovali na skúmavky obmedzujúce pohyb. Skúmavky by nemali zvieratám spôsobovať neprimeraný stres súvisiaci s fyzikálnymi vlastnosťami, teplotou alebo obmedzením pohybu. Obmedzenie môže mať vplyv na fyziologické sledované parametre, ako sú telesná teplota (hypertermia) a/alebo respiračný minútový objem. Ak sú k dispozícii všeobecné údaje, podľa ktorých k takýmto zmenám nedochádza vo veľkej miere, potom nie je potrebné predchádzajúce prispôsobenie obmedzujúcim skúmavkám. Zvieratá vystavené účinkom aerosólu celým telom by sa mali v priebehu expozície umiestniť samostatne, aby sa zabránilo filtrovaniu testovaného aerosólu cez srsť ostatných zvierat v klietke. S výnimkou času trvania expozície sa na kŕmenie môže používať bežné a osvedčené laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou miestnej pitnej vody. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy.

Inhalačné komory

12. Pri výbere inhalačnej komory by sa mal vziať do úvahy charakter testovanej chemikálie a cieľ testu. Uprednostňuje sa expozícia oblasti nosa (pričom tento pojem zahŕňa expozíciu hlavy, nosa alebo pysku). Vo všeobecnosti sa pri štúdiách kvapalných alebo tuhých aerosólov a pár, ktoré môžu kondenzovať a vytvárať aerosóly, uprednostňuje expozícia oblasti nosa. Špeciálne ciele štúdie možno lepšie dosiahnuť použitím expozície celého tela, ale tento krok je potrebné v správe o štúdii odôvodniť. Na zabezpečenie stability prostredia pri používaní komory na expozíciu celého tela by celkový objem testovaných zvierat nemal presiahnuť 5 % objemu komory. Princípy metód expozície celého tela a oblasti nosa a ich konkrétne výhody a nevýhody sú opísané v dokumente GD 39 (2).

PODMIENKY EXPOZÍCIE

Podávanie koncentrácií

13. Expozícia oblasti nosa môže mať pri potkanoch akékoľvek trvanie až do šiestich hodín. Ak sa použije expozícia oblasti nosa pri myšiach, vo všeobecnosti by nemala trvať dlhšie ako štyri hodiny. Ak je potrebné, aby expozícia trvala dlhšie, je nutné uviesť odôvodnenie [pozri dokument GD 39 (2)]. Zvieratá vystavené pôsobeniu aerosólov v komorách na expozíciu celého tela by mali byť umiestnené samostatne, aby sa zabránilo požitiu testovanej chemikálie v dôsledku očisťovania tela ostatnými zvieratami v klietke. Počas trvania expozície by sa zviera nemalo kŕmiť. V priebehu expozície celého tela sa zvieraťu môže podať voda.

14. Zvieratá sú vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie vo forme plynu, pary, aerosólu alebo ich kombinácie. Fyzikálne skupenstvo, ktoré sa testuje, závisí od fyzikálno-chemických vlastností testovanej chemikálie, zvolenej koncentrácie a/alebo najpravdepodobnejšej fyzikálnej formy pri manipulácii a používaní testovanej chemikálie. Hygroskopické a chemicky reaktívne testované chemikálie by sa mali testovať v podmienkach suchého vzduchu. Treba dbať na to, aby sa nevytvorili výbušné koncentrácie.

▼M4

Rozdelenie veľkosti častíc

15. Častice by sa mali rozdeliť podľa veľkosti v prípade všetkých aerosólov a pár, ktoré môžu kondenzovať a vytvárať aerosóly. Na umožnenie expozície všetkých relevantných oblastí dýchacej sústavy sa odporúčajú aerosóly so stredným aerodynamickým hmotnostným priemerom (MMAD) v rozsahu od 1 do 4 μm so štandardnou odchýlkou geometrického priemeru (σ_g) v rozsahu od 1,5 do 3,0 (2) (9) (10). Hoci by sa malo vynaložiť značné úsilie na dodržanie tejto normy, pokiaľ túto podmienku nie je možné splniť, treba predložiť odborný posudok. Napríklad v prípade kovových dymov môžu byť častice menšie, ako stanovuje táto norma, a takisto nabité častice, vlákna a hygroskopické materiály (ktoré sa vo vlhkom prostredí dýchacej sústavy zväčšujú) môžu túto normu prekračovať.

Príprava testovanej chemikálie v nosiči

16. Na prípravu vhodnej koncentrácie a veľkosti častíc testovanej chemikálie v ovzduší možno použiť nosič. Spravidla sa uprednostňuje voda. Tuhý materiál môže byť podrobený mechanickým procesom s cieľom dosiahnuť požadovanú distribúciu veľkosti častíc, treba však dbať na to, aby sa testovaná chemikália nerozložila ani nezmenila. V prípadoch, v ktorých sa usudzuje, že sa pôsobením mechanických procesov zmenilo zloženie testovanej chemikálie (napr. extrémne teploty spôsobené nadmerným mletím v dôsledku trenia), by sa zloženie testovanej chemikálie malo analyticky overiť. Treba dať dostatočný pozor, aby sa testovaná chemikália neznečistila. Nie je potrebné testovať nedrobivé granulované materiály, ktoré sa účelovo pripravujú tak, aby nebolo možné ich inhalovať. Na preukázanie, že pri manipulácii s granulovaným materiálom nevznikajú dýchateľné častice, by sa mal vykonať test opotrebovania. Ak pri teste opotrebovania nevzniknú dýchateľné látky, treba uskutočniť test inhalačnej toxicity.

Kontrolné zvieratá

17. Súbežná negatívna kontrolná skupina (ovzdušia) nie je potrebná. V prípade, že sa na vytvorenie testovacieho ovzdušia použije iný nosič ako voda, sa kontrolná skupina nosiča použije iba vtedy, ak nie sú k dispozícii staršie údaje o inhalačnej toxicite. Ak sa pri štúdii toxicity testovanej chemikálie pripravenej v nosiči nezistí žiadna toxicita, znamená to, že nosič pri testovanej koncentrácii nie je toxický, a teda kontrola nosiča nie je potrebná.

MONITOROVANIE PODMIENOK EXPOZÍCIE

Prúdenie vzduchu v komore

18. Prúdenie vzduchu cez komoru by sa počas každej expozície malo dôkladne kontrolovať, nepretržite monitorovať a zaznamenávať aspoň raz za hodinu. Monitorovanie koncentrácie testovacieho ovzdušia (alebo stability) je integrálne meranie všetkých dynamických parametrov a poskytuje nepriamy prostriedok kontroly všetkých relevantných dynamických parametrov tvorby ovzdušia. Osobitne treba dbať na to, aby sa zabránilo opätovnému vdýchnutiu v komorách na expozíciu oblasti nosa v prípadoch, v ktorých prúdenie vzduchu cez systém expozície nestačí na zabezpečenie dynamického prúdenia vzduchu s testovanou chemikáliou. Existujú predpísané metodiky, prostredníctvom ktorých možno dokázať, že v zvolených prevádzkových podmienkach nedochádza k opätovnému vdýchnutiu (2) (11). Koncentrácia kyslíka by mala byť minimálne 19 % a koncentrácia oxidu uhličitého by nemala presiahnuť 1 %. Ak existuje dôvod domnievať sa, že tieto normy nie je možné splniť, koncentrácie kyslíka a oxidu uhličitého by sa mali zmerať.

▼M4

Teplota komory a relatívna vlhkosť

19. Komora by sa mala udržiavať pri teplote 22 ± 3 °C. Relatívna vlhkosť v dýchacej zóne zvierat, tak v prípade expozície oblasti nosa, ako aj v prípade expozície celého tela, by sa mala monitorovať a zaznamenávať minimálne trikrát počas expozície v trvaní až štyroch hodín a v prípade kratšej expozície každú hodinu. Relatívna vlhkosť by sa ideálne mala udržiavať v rozsahu od 30 do 70 %, ale môže sa stať, že táto hodnota bude nedosiahnuteľná (napr. v prípade testovania zmesí na báze vody) alebo nemerateľná z dôvodu interferencie testovanej chemikálie a testovacej metódy.

Testovaná chemikália: nominálna koncentrácia

20. Vždy, keď je to možné, by sa mala vypočítať a zaznamenať nominálna koncentrácia expozície v komore. Nominálna koncentrácia je hmotnosť vytvorenej testovanej chemikálie vydelená celkovým objemom vzduchu, ktorý prešiel systémom komory. Nominálna koncentrácia sa nepoužíva na charakterizáciu expozície zvierat, ale porovnanie nominálnej a skutočnej koncentrácie vypovedá o účinnosti vytvárania testovacieho systému, a teda sa môže použiť na zistenie problémov s tvorbou.

Testovaná chemikália: skutočná koncentrácia

21. Skutočná koncentrácia je koncentrácia testovanej chemikálie v dýchacej zóne zvierat v inhalačnej komore. Skutočné koncentrácie možno získať špecifickými metódami (napr. priamym odberom vzorky, adsorpčnými alebo chemicky reaktívnymi metódami a následnou analytickou charakterizáciou) alebo nešpecifickými metódami, ako je gravimetrická filtrová analýza. Použitie gravimetrickej analýzy je prípustné iba v prípade jednozložkových práškových aerosólov alebo aerosólov kvapalín s nízkou prchavosťou, pričom je potrebné túto analýzu podložiť primeranými testovými charakterizáciami predbežných štúdií týkajúcich sa konkrétnej chemikálie. Koncentráciu viaczložkových práškových aerosólov možno takisto stanoviť prostredníctvom gravimetrickej analýzy. V tom prípade sú však potrebné analytické údaje, ktoré dokazujú, že zloženie materiálu vo vzduchu je podobné ako zloženie východiskového materiálu. Ak tieto informácie nie sú dostupné, môže byť potrebná opätovná analýza testovanej chemikálie (ideálne v jej skupenstve v ovzduší) v pravidelných intervaloch v priebehu štúdie. V prípade aerosólových látok, ktoré sa môžu vypariť alebo môžu sublimovať, by sa malo preukázať, že všetky fázy sa zhromaždili pomocou zvolenej metódy. V správe o štúdii by sa mali uviesť cieľové, nominálne a skutočné koncentrácie. Na výpočet hodnôt smrteľných koncentrácií sa však v štatistických analýzach použijú iba skutočné koncentrácie.

22. Ak je to možné, mala by sa použiť jedna dávka testovanej chemikálie, pričom testovaná vzorka by sa mala uskladniť za podmienok, za ktorých sa zachová jej čistota, homogenita a stabilita. Pred začatím štúdie by mala byť k dispozícii charakterizácia testovanej chemikálie vrátane jej čistoty a, ak je to technicky možné, identity a množstiev identifikovaných kontaminantov a prímesí. Charakterizáciu možno preukázať napríklad týmito údajmi: retenčný čas a relatívna plocha píku, molekulová hmotnosť získaná pomocou analýzy hmotnostnej spektrometrie alebo plynovej chromatografie alebo iné odhady. Hoci za identitu testovanej vzorky testovacie laboratórium nenesie zodpovednosť, je vhodné, aby testovacie laboratórium aspoň čiastočne potvrdilo charakterizáciu poskytnutú dodávateľom (napr. farbu, fyzikálne skupenstvo atď.).

23. Prostredie expozície by malo byť čo najstálejšie a malo by sa nepretržite a/alebo občasne monitorovať v závislosti od metódy analýzy. Ak sa použije občasný odber vzoriek, vzorky ovzdušia komory by sa mali v priebehu štvorhodinovej štúdie odobrať najmenej dvakrát. Ak to pre nízky prietok vzduchu alebo nízke koncentrácie nie je možné, môže sa v priebehu celého intervalu expozície odobrať jedna vzorka. Ak sa medzi jednotlivými vzorkami vyskytnú výrazné výkyvy, pri ďalších testovaných koncentráciách by sa mali použiť štyri vzorky

▼M4

z každej expozície. Jednotlivé vzorky koncentrácie komory by sa nemali odchýliť od strednej koncentrácie o viac ako ± 10 % v prípade plynov a pár alebo o ± 20 % v prípade kvapalných alebo tuhých aerosólov. Čas na dosiahnutie rovnováhy v komore (t_{95}) by sa mal vypočítať a zaznamenať. Interval expozície zahŕňa čas, keď sa testovaná chemikália tvorí, pričom sa zohľadňujú aj časy potrebné na dosiahnutie t_{95}. Usmernenia k odhadovaniu t_{95} sú uvedené v dokumente GD 39 (2).

24. V prípade veľmi komplexných zmesí tvorených plynmi/parami a aerosólov (napr. spaľovacieho ovzdušia a testovaných chemikálií poháňaných účelovými výrobkami/zariadeniami koncového použitia) sa v inhalačnej komore môže každá fáza správať inak, takže by sa mala vybrať aspoň jedna látka slúžiaca ako ukazovateľ (analyt), najčastejšie hlavná aktívna látka v zmesi, každej fázy (plyn/para a aerosól). Ak je testovaná chemikália zmes, v správe by sa mala uviesť analytická koncentrácia zmesi, nielen aktívnej látky alebo zložky (analytu). Ďalšie informácie týkajúce sa skutočných koncentrácií sú uvedené v dokumente GD 39 (2).

Testovaná chemikália: rozdelenie veľkosti častíc

25. Rozdelenie veľkosti častíc aerosólov by sa malo stanoviť aspoň dvakrát v priebehu každej expozície v trvaní štyroch hodín, a to pomocou kaskádového impaktora alebo alternatívneho prístroja, ako je napríklad aerodynamický spektrometer častíc. Ak možno preukázať rovnocennosť výsledkov získaných pomocou kaskádového impaktora a alternatívneho prístroja, potom sa alternatívny prístroj môže používať počas celej štúdie. Druhé zariadenie, ako je gravimetrický filter alebo impinger/premývačka, by sa malo použiť súbežne s hlavným prístrojom na potvrdenie zachytávacej účinnosti hlavného prístroja. Hmotnostná koncentrácia získaná analýzou veľkosti častíc by mala byť v rozsahu primeraných limitov hmotnostnej koncentrácie získanej filtrovou analýzou [pozri dokument GD 39 (2)]. Ak možno preukázať rovnocennosť v počiatočnej fáze štúdie, nie je potrebné vykonávať ďalšie potvrdzujúce merania. V záujme zabezpečenia dobrých životných podmienok pre zvieratá by sa mali prijať opatrenia na minimalizáciu nejednoznačných údajov, ktoré môžu viesť k potrebe opakovať expozíciu. Rozdelenie veľkosti častíc by sa malo vykonať v prípade pár, ak existuje možnosť, že kondenzácia pary môže mať za následok tvorbu aerosólu, alebo ak sa v ovzduší pár zistia častice s potenciálom zmiešaných fáz (pozri odsek 15).

POSTUP

26. Ďalej v texte sú opísané dva druhy štúdií: tradičný protokol a protokol C × t. Obidva protokoly môžu zahŕňať predbežnú štúdiu, základnú štúdiu a/alebo limitný test (tradičný protokol) alebo testovanie pri limitnej koncentrácii (C × t). Ak je známe, že jedno pohlavie je vnímavejšie, vedúci štúdie môže rozhodnúť, že sa na tieto štúdie použije iba vnímavejšie pohlavie. Ak sa v prípade iných hlodavcov ako potkanov použije expozícia oblasti nosa, maximálne trvanie expozície je možné prispôsobiť s cieľom minimalizovať druhovo špecifické utrpenie. Pred začatím by sa mali zvážiť všetky dostupné údaje, aby sa minimalizovalo využívanie zvierat. Napríklad údaje získané s využitím kapitoly B.52 tejto prílohy (4) môžu eliminovať potrebu predbežnej štúdie a môžu takisto preukázať, či je jedno pohlavie vnímavejšie [pozri dokument GD 39 (2)].

▼M4

TRADIČNÝ PROTOKOL

Všeobecné úvahy: Tradičný protokol

27. Pri tradičnej štúdii sú skupiny zvierat vystavené účinkom testovanej chemikálie počas pevne stanoveného obdobia (vo všeobecnosti štyri hodiny) buď v komore na expozíciu oblasti nosa, alebo v komore na expozíciu celého tela. Zvieratá sú exponované limitnej koncentrácii (limitný test) alebo v prípade postupu zahŕňajúceho viac krokov najmenej trom koncentráciám (základná štúdia). Základnej štúdii môže predchádzať predbežná štúdia, pokiaľ neexistujú informácie o testovanej látke, ako je napríklad štúdia B.52 uskutočnená skôr [pozri GD 39 (2)].

Predbežná štúdia: Tradičný protokol

28. Predbežná štúdia sa používa na odhad potencie testovanej chemikálie, identifikáciu rozdielov medzi pohlaviami, pokiaľ ide o vnímavosť, a pomoc pri výbere úrovní koncentrácie pri expozícii pre základnú štúdiu alebo pre limitný test. Pri výbere úrovní koncentrácie na účely predbežnej štúdie by sa mali použiť všetky dostupné informácie vrátane údajov (Q)SAR a údajov o podobných chemikáliách. Pri každej koncentrácii by sa nemali exponovať viac ako tri samce a tri samice (na stanovenie rozdielov medzi pohlaviami môžu byť potrebné tri zvieratá z každého pohlavia). Predbežná štúdia sa môže vykonávať s využitím jednej koncentrácie, ale v prípade potreby je možné testovať aj viac koncentrácií. V rámci predbežnej štúdie by sa nemal testovať taký počet zvierat a koncentrácií, ktorý by pripomínal základnú štúdiu. Namiesto predbežnej štúdie sa môže použiť štúdia B.52 (4) uskutočnená skôr [pozri dokument GD 39 (2)].

Limitný test: Tradičný protokol

29. Limitný test sa používa, ak je známe alebo sa predpokladá, že testovaná chemikália je v podstate netoxická, t. j. vyvoláva toxickú reakciu iba pri koncentrácii vyššej, ako je regulačná limitná koncentrácia. Pri limitnom teste sa jedna skupina troch samcov a troch samíc exponuje testovanej chemikálii pri limitnej koncentrácii. Informácie o toxicite testovanej chemikálie možno získať z poznatkov o podobných testovaných chemikáliách pri zohľadnení identity a percenta zložiek, o ktorých je známe, že sú toxikologicky významné. V situáciách, keď existuje málo informácií alebo neexistujú žiadne informácie o jej toxicite, alebo ak sa očakáva, že testovaná chemikália bude toxická, je potrebné vykonať základný test.

30. Výber limitných koncentrácií zvyčajne závisí od regulačných požiadaviek. Ak sa použije nariadenie (ES) č. 1272/2008, limitná koncentrácia v prípade plynov je 20 000 ppm, v prípade pár 20 mg/l a v prípade aerosólov 5 mg/l (alebo maximálna dosiahnuteľná koncentrácia) (3). V prípade niektorých testovaných chemikálií, najmä vo forme pár a aerosólov, môže byť technicky náročné pripraviť limitné koncentrácie. Pri testovaní aerosólov by hlavným cieľom malo byť dosiahnutie dýchateľnej veľkosti častíc (MMAD 1 – 4 μm). V prípade väčšiny testovaných chemikálií je túto veľkosť možné dosiahnuť pri koncentrácii 2 mg/l. O testovanie aerosólov pri koncentrácii vyššej ako 2 mg/l sa možno pokúšať, iba ak je možné získať dýchateľnú veľkosť častíc [pozri dokument GD 39 (2)]. V nariadení (ES) č. 1272/2008 sa z dôvodu starostlivosti o zvieratá neodporúča testovanie pri koncentrácii vyššej, ako je limitná koncentrácia (3). Limitná koncentrácia by sa mala zvažovať iba vtedy, ak existuje vysoká pravdepodobnosť, že výsledky takéhoto testu by mali priamy význam pre ochranu ľudského zdravia (3), pričom do správy o štúdii treba uviesť odôvodnenie. V prípade potenciálne výbušných testovaných chemikálií treba dbať na to, aby nenastali podmienky, ktoré by mohli viesť k výbuchu. S cieľom zabrániť zbytočnému využívaniu zvierat by sa malo pred limitným testom vykonať testovacie kolo bez zvierat, aby sa zabezpečilo, že v komore je možné dosiahnuť podmienky na účely limitného testu.

▼M4

31. Ak sa pri limitnej koncentrácii pozoruje mortalita alebo moribundita, výsledky limitného testu môžu slúžiť ako predbežná štúdia pre ďalšie testovanie pri iných koncentráciách (pozri základnú štúdiu). Ak fyzikálne alebo chemické vlastnosti testovanej chemikálie znemožňujú dosiahnutie limitnej koncentrácie, mala by sa testovať maximálna dosiahnuteľná koncentrácia. Ak sa pri maximálnej dosiahnuteľnej koncentrácii vyskytne letalita nižšia ako 50 %, ďalšie testovanie nie je potrebné. Ak nebolo možné dosiahnuť limitnú koncentráciu, v správe o štúdii treba uviesť vysvetlenie a podložiť ho údajmi. Ak maximálna dosiahnuteľná koncentrácia pary nevyvoláva toxicitu, môže byť potrebné pripraviť testovanú chemikáliu ako kvapalný aerosól.

Základná štúdia: Tradičný protokol

32. Základná štúdia sa zvyčajne vykonáva s využitím piatich samcov a piatich samíc (alebo päť zvierat vnímavejšieho pohlavia, ak je známe) pri jednej úrovni koncentrácie, pričom sa testujú najmenej tri úrovne koncentrácie. Na zabezpečenie dôkladnej štatistickej analýzy by sa mali použiť dostatočné úrovne koncentrácie. Časový interval medzi skupinami expozícií je určený nástupom, trvaním a závažnosťou príznakov toxicity. Expozícia zvierat pri ďalšej úrovni koncentrácie by sa mala odložiť, kým sa nenadobudne dostatočná dôvera, že zvieratá, ktoré boli testované, prežijú. To umožní vedúcemu štúdie, aby prispôsobil cieľovú koncentráciu pre ďalšiu expozičnú skupinu. Z dôvodu závislosti od sofistikovaných technológií to v prípade inhalačných štúdií nemusí byť vždy možné, takže expozícia zvierat pri ďalšej úrovni koncentrácie by mala vychádzať z predchádzajúcich skúseností a vedeckého posudku. Pri testovaní zmesí si treba preštudovať dokument GD 39 (2).

PROTOKOL KONCENTRÁCIA × ČAS (C × t)

Všeobecné úvahy: Protokol C × t

33. O štúdii C × t pozostávajúcej z viacerých krokov možno pri hodnotení inhalačnej toxicity uvažovať ako o alternatíve k tradičnému protokolu (12) (13) (14). Tento prístup umožňuje, aby boli zvieratá exponované testovanej chemikálii pri viacerých úrovniach koncentrácie a počas niekoľkých časových intervalov. Celé testovanie prebieha v komore na expozíciu oblasti nosa (v prípade tohto protokolu nie je možné použiť komory na expozíciu celého tela). Tento protokol je znázornený v tokovom diagrame v dodatku 1. Zo simulačnej analýzy vyplynulo, že v prípade tradičného protokolu, ako aj v prípade protokolu C × t možno získať spoľahlivé hodnoty LC_{50}, ale protokol C × t je všeobecne lepší na získanie spoľahlivých hodnôt LC_{01} a LC_{10} (15).

34. Simulačná analýza preukázala, že využívanie dvoch zvierat pre jeden interval C × t (jedno zviera z každého pohlavia pri použití oboch pohlaví alebo dve zvieratá vnímavejšieho pohlavia) môže byť vo všeobecnosti v prípade základnej štúdie vhodné pri testovaní štyroch koncentrácií a piatich intervalov expozície. Za určitých okolností sa vedúci štúdie môže rozhodnúť pre použitie dvoch potkanov z každého pohlavia pre jeden interval C × t (15). Použitie dvoch zvierat z každého pohlavia na jednu koncentráciu a časový bod môže znížiť chybu a variabilitu odhadov, zvýšiť úspešnosť odhadu a zvýšiť istotu, pokiaľ ide o rozsah intervalov. V prípade nedostatočne presnej zhody s údajmi pre odhad (pri použití jedného zvieraťa z každého pohlavia alebo dvoch zvierat vnímavejšieho pohlavia) môže postačovať aj piata expozičná koncentrácia. Ďalšie usmernenia týkajúce sa počtu zvierat a koncentrácií, ktoré sa majú použiť v prípade štúdie C × t, sú uvedené v dokumente GD 39 (2).

▼M4

Predbežná štúdia: Protokol C × t

35. Predbežná štúdia sa používa na odhad potencie testovanej chemikálie a na pomoc pri výbere úrovní expozičných koncentrácií pre základnú štúdiu. Pri predbežnej štúdii, pri ktorej sa využívajú až tri zvieratá z každého pohlavia na koncentráciu [podrobnejšie informácie sú uvedené v dodatku III dokumentu GD 39 (2)], môže byť potrebné vybrať vhodnú počiatočnú koncentráciu pre základnú štúdiu a minimalizovať počet použitých zvierat. Na zistenie rozdielov medzi pohlaviami môže byť nevyhnutné použiť tri zvieratá z každého pohlavia. Tieto zvieratá by sa mali jednorazovo exponovať zvyčajne počas 240 minút. Otázka, či je možné vytvoriť vhodné testovacie ovzdušie, by sa mala posúdiť v priebehu predbežných technických testov bez zvierat. Vo všeobecnosti nie je potrebné vykonávať predbežnú štúdiu, ak sú k dispozícii údaje o mortalite zo štúdie B.52 (4). Pri výbere počiatočnej cieľovej koncentrácie v štúdii B.2 by mal vedúci štúdie zohľadniť štruktúru mortality pozorovanú pri všetkých dostupných štúdiách B.52 (4) pri oboch pohlaviach a pri všetkých testovaných koncentráciách [pozri dokument GD 39 (2)].

Počiatočná koncentrácia: Protokol C × t

36. Počiatočná koncentrácia (expozičné kolo I) (dodatok 1) bude buď limitná koncentrácia, alebo koncentrácia, ktorú vyberie vedúci štúdie na základe predbežnej štúdie. Skupiny po jednom zvierati z každého pohlavia sú exponované tejto koncentrácii počas niekoľkých intervalov (napr. 15, 30, 60, 120 alebo 240 minút), čo vedie k celkovému počtu desiatich zvierat (tzv. expozičné kolo I) (dodatok 1).

37. Výber limitných koncentrácií zvyčajne závisí od regulačných požiadaviek. Ak sa použije nariadenie (ES) č. 1272/2008, limitná koncentrácia v prípade plynov je 20 000 ppm, v prípade pár 20 mg/l a v prípade aerosólov 5 mg/l (alebo maximálna dosiahnuteľná koncentrácia) (3). V prípade niektorých testovaných chemikálií, najmä vo forme pár a aerosólov, môže byť technicky náročné pripraviť limitné koncentrácie. Pri testovaní aerosólov by malo byť cieľom dosiahnutie dýchateľnej veľkosti častíc (t. j. MMAD 1 – 4 μm) pri limitnej koncentrácii 2 mg/l. Túto veľkosť je možné dosiahnuť v prípade väčšiny testovaných chemikálií. O testovanie aerosólov pri koncentrácii vyššej ako 2 mg/l sa možno pokúšať, iba ak je možné získať dýchateľnú veľkosť častíc [pozri dokument GD 39 (2)]. V nariadení (ES) č. 1272/2008 sa z dôvodu starostlivosti o zvieratá neodporúča testovanie pri koncentrácii vyššej, ako je limitná koncentrácia (3). Testovanie pri limitnej koncentrácii by sa malo zvažovať iba vtedy, ak existuje vysoká pravdepodobnosť, že výsledky takéhoto testu by mali priamy význam pre ochranu ľudského zdravia (3), pričom do správy o štúdii treba uviesť odôvodnenie. V prípade potenciálne výbušných testovaných chemikálií treba dbať na to, aby nenastali podmienky, ktoré by mohli viesť k výbuchu. S cieľom zabrániť zbytočnému využívaniu zvierat by sa malo pred testovaním pri počiatočnej koncentrácii vykonať testovacie kolo bez zvierat, aby sa zaistilo, že v komore je možné zabezpečiť podmienky na dosiahnutie tejto koncentrácie.

38. Ak sa pri počiatočnej koncentrácii pozoruje mortalita alebo moribundita, výsledky pri tejto koncentrácii môžu slúžiť ako východisko na ďalšie testovanie pri iných koncentráciách (pozri základnú štúdiu). Ak fyzikálne alebo chemické vlastnosti testovanej chemikálie znemožňujú dosiahnutie limitnej koncentrácie, mala by sa testovať maximálna dosiahnuteľná koncentrácia. Ak sa pri maximálnej dosiahnuteľnej koncentrácii vyskytne letalita nižšia ako 50 %, ďalšie testovanie nie je potrebné. Ak nebolo možné dosiahnuť limitnú koncentráciu, v správe o štúdii treba uviesť vysvetlenie a podložiť ho údajmi. Ak maximálna dosiahnuteľná koncentrácia pary nevyvoláva toxicitu, môže byť potrebné pripraviť testovanú chemikáliu ako kvapalný aerosól.

▼M4

Základná štúdia: Protokol C × t

39. Počiatočná koncentrácia (expozičné kolo I) (dodatok 1) testovaná v rámci základnej štúdie bude buď limitná koncentrácia, alebo koncentrácia, ktorú vyberie vedúci štúdie na základe predbežnej štúdie. Ak sa v priebehu alebo po kole expozície I pozoruje mortalita, minimálna expozícia (C × t), ktorá má za následok mortalitu, sa použije ako smerodajný údaj na stanovenie koncentrácie a intervalov expozície pre kolo expozície II. Každé následné kolo expozície bude závisieť od predchádzajúceho kola (pozri dodatok 1).

40. V prípade mnohých testovaných chemikálií budú výsledky získané pri počiatočnej koncentrácii spolu s tromi ďalšími kolami expozície s využitím hustejšej súradnicovej siete (t. j. geometrického rozloženia intervalov expozície určeného faktorom medzi intervalmi, ktoré nasledujú po sebe, zvyčajne s hodnotou √2) na stanovenie závislosti mortality v rámci štúdie C × t postačujúce (15). Použitie piatej expozičnej koncentrácie však môže mať isté výhody [pozri dodatok 1 a dokument GD 39 (2)]. Matematická úprava výsledkov protokolu C × t je uvedená v dodatku 1.

POZOROVANIA

41. Zvieratá by sa mali v priebehu trvania expozície pravidelne klinicky pozorovať. Po expozícii by sa mali klinické pozorovania vykonať najmenej dvakrát v deň expozície alebo častejšie, ak to indikuje reakcia zvierat na testovanie, a následne najmenej raz denne počas 14 dní. Dĺžka pozorovania nie je presne určená, ale mala by sa stanoviť podľa charakteru a času nástupu klinických príznakov a dĺžky obdobia zotavenia. Časy, keď sa objavia a zmiznú príznaky toxicity, sú dôležité, predovšetkým v prípade tendencie oneskorenia príznakov toxicity. Všetky pozorovania sa systematicky zaznamenávajú, pričom každé zviera má individuálny záznam. Moribundné zvieratá a zvieratá, ktoré majú očividne silné bolesti a/alebo vykazujú pretrvávajúce príznaky silného utrpenia, by sa mali z dôvodu starostlivosti o zvieratá humánnym spôsobom utratiť. Pri vyšetrovaní klinických príznakov toxicity treba dávať pozor, aby sa počiatočný nepatrný nález a krátkodobé zmeny dýchania, ktoré sú dôsledkom expozície, nezamieňali za toxicitu súvisiacu s testovanou chemikáliou, ktorá by vyžadovala predčasné utratenie zvierat. Zohľadnia sa zásady a kritériá zosumarizované v usmerňujúcom dokumente o humánnych parametroch (Humane Endpoints Guidance Document) (GD 19) (7). Keď sa zvieratá usmrtia z humánnych dôvodov alebo sa nájdu uhynuté, je potrebné čo možno najpresnejšie zaznamenať čas uhynutia.

42. Pozorovania v klietkach sa zameriavajú na zmeny kože, srsti, očí, slizníc, dýchania, krvného obehu, autonómneho a centrálneho nervového systému, ako aj somatomotoriky a správania. Ak je to možné, zaznamená sa každý rozdiel medzi lokálnymi a systémovými účinkami. Pozornosť sa zameriava na pozorovanie triašky, kŕčov, slinenia, hnačky, letargie, spánku a kómy. Meraním rektálnej teploty možno získať dôkazy svedčiace o reflexnej bradypney alebo hypo/hypertermii, ktoré súvisia s testovaním alebo s obmedzením pohybu.

Telesné hmotnosti

43. Individuálne hmotnosti zvierat by sa mali zaznamenať raz počas obdobia aklimatizácie, v deň expozície pred expozíciou (deň 0), minimálne v dňoch 1, 3 a 7 (a následne raz za týždeň) a v čase uhynutia alebo utratenia, pokiaľ k nemu dôjde po dni 1. Telesná hmotnosť sa považuje za kritický ukazovateľ toxicity, takže zvieratá, pri ktorých nastane trvalý úbytok hmotnosti ≥ 20 % v porovnaní s hodnotami pred štúdiou, by sa mali pozorne sledovať. Zvieratá, ktoré prežijú, sa na konci obdobia po expozícii odvážia a humánne usmrtia.

▼M4

Patológia

44. Všetky testované zvieratá vrátane tých, ktoré uhynú počas testu alebo sa utratia a vylúčia zo štúdie z dôvodu starostlivosti o zvieratá, sa podrobujú autopsii. Ak nie je možné vykonať autopsiu ihneď po objavení uhynutého zvieraťa, zviera sa schladí (nie zmrazí) na dostatočne nízku teplotu, aby sa minimalizovala autolýza. Autopsie by sa mali vykonať čo najskôr, zvyčajne v priebehu jedného alebo dvoch dní. Pri každom zvierati sa zaznamenajú všetky makroskopické patologické zmeny, pričom osobitná pozornosť sa venuje akýmkoľvek zmenám v dýchacej sústave.

45. Na účely zvýšenia výpovednej hodnoty štúdie možno zvážiť ďalšie vyšetrenia a priori zahrnuté od začiatku, ako je meranie hmotnosti pľúc potkanov, ktoré prežili, a/alebo poskytnutie dôkazov o podráždení prostredníctvom mikroskopického vyšetrenia dýchacej sústavy. Medzi skúmané orgány môžu patriť aj orgány, ktoré svedčia o makroskopickej patológii pri zvieratách, ktoré prežili 24 alebo viac hodín, a orgány, o ktorých je známe alebo pri ktorých sa predpokladá, že boli zasiahnuté. Mikroskopické vyšetrenie celej dýchacej sústavy môže poskytnúť užitočné informácie o testovaných chemikáliách, ktoré reagujú s vodou, ako sú kyseliny a hygroskopické testované chemikálie.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

46. Treba uviesť údaje o telesnej hmotnosti a pitevných nálezoch jednotlivých zvierat. Údaje z klinických pozorovaní sa zhrnú v podobe tabuliek, kde sa uvedie pre každú pokusnú skupinu počet použitých zvierat, počet zvierat vykazujúcich špecifické príznaky toxicity, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu alebo ich usmrtili z humánnych dôvodov, čas uhynutia jednotlivých zvierat, opis a časový priebeh toxických účinkov a reverzibility a pitevné nálezy.

Správa o teste

47. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testované zvieratá a chov:

— opis podmienok v klietkach vrátane: počtu (alebo zmeny počtu) zvierat na klietku, výstelky, teploty prostredia a relatívnej vlhkosti, dĺžky svetlej fázy a identifikácie krmiva,

— použité druhy/kmene a odôvodnenie použitia druhov iných ako potkany,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— metóda randomizácie,

— údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu/zdroja krmiva, zdroja vody),

— opis akýchkoľvek podmienok pred testovaním vrátane krmiva, karantény a liečby chorôb.

▼**M4**

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter, čistota a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti (vrátane izomerizácie),

— identifikačné údaje a registračné číslo CAS (Chemical Abstract Services), ak je známe.

Nosič:

— odôvodnenie použitia nosiča a odôvodnenie výberu nosiča (ak je iný ako voda),

— historické alebo súčasné údaje preukazujúce, že nosič nemá vplyv na výsledky štúdie.

Inhalačná komora:

— opis inhalačnej komory vrátane rozmerov a objemu,

— zdroj a opis zariadenia použitého na expozíciu zvierat, ako aj na vytvorenie ovzdušia,

— zariadenie na meranie teploty, vlhkosti, veľkosti častíc a skutočnej koncentrácie,

— zdroj vzduchu a manipulácia s dodaným/extrahovaným vzduchom a použitý klimatizačný systém,

— metódy použité na kalibráciu zariadenia s cieľom zabezpečiť homogénne testovacie ovzdušie,

— rozdiel tlakov (pozitívny alebo negatívny),

— expozičné otvory na jednu komoru (v prípade expozície oblasti nosa), umiestnenie zvierat v systéme (v prípade expozície celého tela),

— dočasná homogenita/stabilita testovacieho ovzdušia,

— umiestnenie senzorov teploty a vlhkosti a odber vzorky testovacieho ovzdušia v komore,

— hodnoty prietoku vzduchu, prietok vzduchu na jeden expozičný otvor (v prípade expozície oblasti nosa) alebo množstvo zvierat na komoru (v prípade expozície celého tela),

— informácie o zariadení použitom na meranie kyslíka a oxidu uhličitého, ak sa použilo,

— čas potrebný na dosiahnutie rovnováhy v inhalačnej komore (t_{95}),

— počet zmien objemu za hodinu,

— meracie prístroje (ak sa použili).

Údaje o expozícii:

— odôvodnenie výberu cieľovej koncentrácie pre základnú štúdiu,

— nominálne koncentrácie (celková hmotnosť testovanej chemikálie aplikovanej do inhalačnej komory vydelená objemom vzduchu, ktorý prešiel komorou),

— skutočné koncentrácie testovanej chemikálie zachytenej z dýchacej zóny zvierat, v prípade zmesí, ktoré vytvárajú heterogénne fyzikálne skupenstvá (plyny, pary, aerosóly) možno každé skupenstvo analyzovať samostatne,

▼M4

— všetky koncentrácie ovzdušia sa zaznamenajú v hmotnostných jednotkách (napr. mg/l, mg/m^3 atď.), v zátvorke možno uviesť aj objemové jednotky (napr. ppm, ppb atď.),

— rozdelenie veľkosti častíc, stredný aerodynamický hmotnostný priemer (MMAD) a štandardná odchýlka geometrického priemeru (σg) vrátane metód ich výpočtu. Jednotlivé analýzy veľkosti častíc sa uvedú v správe.

Podmienky testovania:

— podrobné informácie o príprave testovanej chemikálie vrátane podrobných údajov o všetkých postupoch použitých na zmenšenie veľkosti častíc tuhých materiálov alebo na prípravu roztokov testovanej chemikálie. V prípadoch, v ktorých v dôsledku mechanických procesov mohlo dôjsť k zmene zloženia testovanej chemikálie, sa uvedú výsledky analýzy na overenie zloženia testovanej chemikálie,

— opis (podľa možnosti spolu s nákresom) zariadenia použitého na vytvorenie testovacieho ovzdušia a na expozíciu zvierat testovaciemu ovzdušiu,

— podrobné informácie o použitej chemickej analytickej metóde a o overení metódy (vrátane účinnosti výťažnosti testovanej chemikálie z prostriedku na odber vzorky),

— odôvodnenie výberu testovacích koncentrácií.

Výsledky:

— tabuľkové spracovanie teploty, vlhkosti a prúdenia vzduchu v komore,

— tabuľkové spracovanie údajov o nominálnych a skutočných koncentráciách,

— tabuľkové spracovanie údajov o veľkosti častíc vrátane údajov o odbere vzoriek na analýzu, o rozdelení veľkosti častíc a o výpočtoch MMAD a σ_g,

— tabuľkové spracovanie získaných údajov o reakcii a úrovni koncentrácie pre každé zviera (t. j. zvieratá vykazujúce príznaky toxicity vrátane mortality, charakteru, závažnosti, času nástupu a trvania účinkov),

— telesné hmotnosti jednotlivých zvierat zistené počas štúdie, dátum a čas uhynutia, ak k nemu došlo pred plánovaným utratením, časový priebeh nástupu príznakov toxicity a skutočnosť, či tieto príznaky boli reverzibilné pre každé zviera,

— pitevné nálezy a histopatologické nálezy pre každé zviera, ak sú k dispozícii,

— odhady letality (napr. LC_{50}, LD_{01}) vrátane 95 % hranice spoľahlivosti a sklon (ak je v rámci metódy hodnotenia k dispozícii),

— štatistický vzťah vrátane odhadu exponenta n (protokol C × t). Uvedie sa názov použitého štatistického softvéru.

▼M4

Rozbor a interpretácia výsledkov:

— osobitný dôraz sa kladie na opis metód použitých na splnenie kritérií tejto testovacej metódy, napr. limitnej koncentrácie alebo veľkosti častíc,

— dýchateľnosť častíc vzhľadom na celkové zistenia sa uvedie, najmä ak nebolo možné splniť kritériá na veľkosť častíc,

— uvedie sa vysvetlenie, ak bolo potrebné humánnym spôsobom utratiť zvieratá, ktoré mali bolesti alebo vykazovali príznaky silného alebo pretrvávajúceho utrpenia, v súlade s kritériami v usmerňovacom dokumente OECD o humánnych parametroch (Guidance Document on Humane Endpoints) (8),

— ak bolo testovanie podľa kapitoly B.52 tejto prílohy (4) prerušené v prospech tejto testovacej metódy B.2, uvedie sa odôvodnenie,

— konzistencia metód použitých na stanovenie nominálnej a skutočnej koncentrácie a vzťah skutočnej koncentrácie k nominálnej koncentrácii sa uvedú v celkovom hodnotení štúdie,

— uvedie sa pravdepodobná príčina uhynutia a prevládajúci druh pôsobenia (systémové verzus lokálne).

LITERATÚRA

1. OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paríž. K dispozícii na: [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, Paríž. K dispozícii na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

3. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006 (Ú. v. EÚ L 353, 31.12.2008, s. 1).

4. Kapitola B.52 tejto prílohy, Akútna inhalačná toxicita – metóda akútnej toxickej triedy (ATC).

5. Kapitola B.40 tejto prílohy, Poleptanie kože *in vitro*: test pomocou transkutánneho elektrického odporu (TER).

6. Kapitola B.40a tejto prílohy, Poleptanie kože *in vitro*: test pomocou modelu ľudskej kože.

7. OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paríž. K dispozícii na: [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, Paríž. K dispozícii na: [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, R. F. (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (druhé vydanie) Informa Healthcare, New York.

▼**M4**

11. Pauluhn, J., a Thiel, A. (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160 – 167.

12. Zwart, J. H. E., Arts, J. M., ten Berge, W. F., Appelman, L. M. (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, J. H. E., Arts, J. M., Klokman-Houweling, E. D., Schoen, E. D. (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105 – 117.

14. Ten Berge, W. F., a 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, Paríž. K dispozícii na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

16. Finney, D. J. (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, Londýn/New York.

VYMEDZENIE POJMU

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M4

Dodatok 1

Protokol C × t

1. O štúdii „koncentrácia × čas“ (C × t) pozostávajúcej z viacerých krokov možno pri hodnotení inhalačnej toxicity uvažovať ako o alternatíve k tradičnému protokolu (12) (13) (14). Jej vykonanie sa uprednostňuje, ak existuje konkrétna regulačná alebo vedecká potreba, ktorá vyžaduje testovanie na zvieratách počas niekoľkých intervalov, ako napr. v prípade plánovania núdzovej reakcie alebo plánovania využitia krajiny. Tento prístup sa zvyčajne začína testovaním limitnej koncentrácie (kolo expozície I), v rámci ktorého sú zvieratá exponované testovanej chemikálii počas piatich časových intervalov (napr. 15, 30, 60, 120 a 240 minút), takže jedno kolo expozície zahŕňa väčší počet časových intervalov (pozri obrázok 1). Ak sa použije nariadenie (ES) č. 1272/2008, limitná koncentrácia v prípade plynov je 20 000 ppm, v prípade pár 20 mg/l a v prípade aerosólov 5 mg/l. Tieto úrovne možno prekročiť iba vtedy, ak existuje regulačná alebo vedecká potreba testovania pri týchto úrovniach (pozri odsek 37 v hlavnom texte kapitoly B.2).

2. V situáciách, keď je k dispozícii málo informácií o toxicite testovanej chemikálie alebo nie sú k dispozícii žiadne informácie, sa vykoná predbežná štúdia, v rámci ktorej sú skupiny maximálne troch zvierat z každého pohlavia exponované cieľovým koncentráciám, ktoré vyberie vedúci štúdie, zvyčajne počas 240 minút.

3. Ak sa limitná koncentrácia testuje počas kola expozície I a je pozorovaná mortalita nižšia ako 50 %, ďalšie testovanie nie je potrebné. Ak existuje regulačná alebo vedecká potreba, aby sa stanovil vzťah medzi koncentráciou, časom a reakciou pri vyšších úrovniach, ako je indikovaná limitná koncentrácia, ďalšia expozícia sa vykoná pri vyššej úrovni, napríklad pri dvojnásobku limitnej koncentrácie (t. j. 2L na obrázku 1).

4. Ak sa pri limitnej koncentrácii zistí toxicita, je potrebné ďalšie testovanie (základná štúdia). Tieto ďalšie expozície sa vykonajú buď pri nižších koncentráciách (na obrázku 1: kolá expozície II, III alebo IV‘), alebo pri vyšších koncentráciách s využitím kratších časových intervalov (na obrázku 1: kolo expozície IV), ktoré sú prispôsobené a medzi ktorými nie je veľký časový odstup.

5. Test (počiatočná a ďalšia koncentrácia) sa vykoná s využitím jedného zvieraťa z každého pohlavia na koncentráciu/časový bod alebo dvoch zvierat vnímavejšieho pohlavia na koncentráciu/časový bod. Za určitých okolností sa vedúci štúdie môže rozhodnúť pre použitie dvoch potkanov z každého pohlavia na koncentráciu/časový bod (alebo štyroch zvierat vnímavejšieho pohlavia na koncentráciu/časový bod) (15). Použitie dvoch zvierat z každého pohlavia na koncentráciu/časový bod vo všeobecnosti znižuje chybu a variabilitu odhadov, zvyšuje úspešnosť odhadu a zvyšuje istotu, pokiaľ ide o rozsah intervalov v súvislosti s protokolom, ktorý je v tomto texte opísaný. Ďalšie informácie sú uvedené v dokumente GD 39 (2).

6. Podľa možnosti sa každé kolo expozície uskutoční v jeden deň. Vďaka tomu možno odložiť ďalšiu expozíciu, kým sa nenadobudne primeraná istota prežitia zvierat, a vedúci štúdie môže prispôsobiť cieľovú koncentráciu a intervaly pre ďalšie kolo expozície. Odporúča sa začať každé kolo expozície skupinou, ktorá bude exponovaná najdlhšie, napr. skupinou na 240-minútovú expozíciu, po ktorej nasleduje skupina na 120-minútovú expozíciu atď. Ak napríklad zvieratá v skupine na 240-minútovú expozíciu hynú po 90 minútach alebo vykazujú závažné príznaky toxicity (napr. extrémne zmeny v dýchaní, ako je napríklad namáhavé dýchanie), nemá význam exponovať skupinu na 120 minút, lebo mortalita by pravdepodobne dosiahla 100 %. Vedúci štúdie preto pre danú koncentráciu zvolí kratšie intervaly expozície (napr. 90, 65, 45, 33 a 25 minút).

▼M4

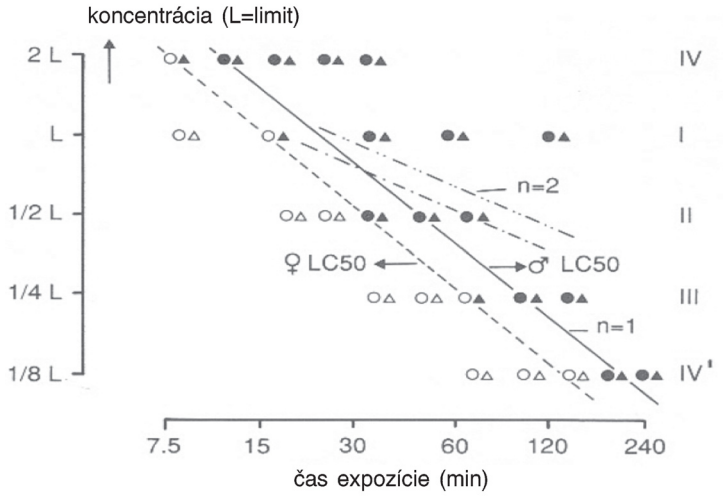
7. Koncentrácia v komore sa musí často merať, aby sa stanovil časovo vážený priemer koncentrácií pre každý interval expozície. Ak je to možné, v štatistickej analýze sa použije čas uhynutia každého zvieraťa (nie interval expozície).

8. Výsledky prvých štyroch kôl expozície sa preskúmajú s cieľom zistiť chýbajúce údaje na krivke závislosti koncentrácie a času (pozri obrázok 1). V prípade nedostatočnej zhody sa môže vykonať ďalšia expozícia (piata koncentrácia). Koncentrácia a intervaly expozície sa v prípade piatej expozície vyberú tak, aby sa zistili tieto chýbajúce údaje.

9. Všetky kolá expozície (vrátane prvého kola expozície) sa použijú na výpočet vzťahu medzi koncentráciou, časom a reakciou s využitím štatistickej analýzy (16). Ak je to možné, pre každý interval C × t sa použije časovo vážený priemer koncentrácií a trvanie expozície až do uhynutia (ak k uhynutiu došlo v priebehu expozície).

Obrázok 1

Hypotetické znázornenie vzťahu medzi koncentráciou, časom a mortalitou pri potkanoch



Prázdne symboly = zvieratá, ktoré prežili; plné symboly = uhynuté zvieratá.

Trojuholníky = samice; kruhy = samce.

Plná čiara = hodnoty LC_{50} (rozsah 7,5 – 240 min.) pre samce, ak n = 1.

Prerušovaná čiara = hodnoty LC_{50} (rozsah 7,5 – 240 min.) pre samice, ak n = 1.

Bodkované čiary = funkcia hypotetických hodnôt LC_{50} pre samce a samice, ak n = 2 (12).

Glosár

Koncentrácia:

Čas expozície:

▼M4

10. Ďalej je uvedený príklad postupu pozostávajúceho z viacerých krokov:

Kolo expozície I – testovanie pri limitnej koncentrácii (pozri obrázok 1)

— 1 zviera z každého pohlavia na koncentráciu/časový bod, spolu desať zvierat ([a])

— cieľová koncentrácia ([b]) = limitná koncentrácia,

— exponujte päť skupín zvierat pri tejto cieľovej koncentrácii počas intervalov 15, 30, 60, 120 a 240 minút.

↓

Kolo expozície II ([c]) – základná štúdia

— 1 zviera z každého pohlavia na koncentráciu/časový bod, spolu desať zvierat,

— exponujte päť skupín zvierat pri nižšej koncentrácii ([d]) (1/2L) počas o niečo dlhších intervalov expozície (faktor √2 s využitím odstupov, pozri obrázok 1).

↓

Kolo expozície III – základná štúdia

— 1 zviera z každého pohlavia na koncentráciu/časový bod, spolu desať zvierat,

— exponujte päť skupín zvierat pri nižšej koncentrácii ([d]) (1/4L) počas o niečo dlhších intervalov expozície (faktor √2 s využitím odstupov, pozri obrázok 1).

↓

Kolo expozície IV‘ – základná štúdia

— 1 zviera z každého pohlavia na koncentráciu/časový bod, spolu desať zvierat,

— exponujte päť skupín zvierat pri nižšej koncentrácii ([d]) (1/8L) počas o niečo dlhších intervalov expozície (faktor √2 s využitím odstupov, pozri obrázok 1).

↓ alebo

([a]) Ak nie sú k dispozícii informácie o vnímavosti pohlaví, použijú sa potkany oboch pohlaví, t. j. jedno zviera z každého pohlavia na koncentráciu. Na základe existujúcich informácií alebo ak v priebehu tohto kola expozície vyjde najavo, že jedno pohlavie je vnímavejšie, v priebehu ďalšieho testovania sa použije desať zvierat vnímavejšieho pohlavia (dve zvieratá na koncentráciu/časový bod) pri každej úrovni koncentrácie.,

([b]) Ak sa použije nariadenie (ES) č. 1272/2008, limitná koncentrácia v prípade plynov je 20 000 ppm, v prípade pár 20 mg/l a v prípade aerosólov 5 mg/l. V prípade predpokladanej toxicity alebo na základe výsledkov predbežnej štúdie sa zvolia nižšie počiatočné koncentrácie. V prípade regulačnej alebo vedeckej potreby možno použiť vyššie koncentrácie.

([c]) Expozícia zvierat pri ďalšej úrovni koncentrácie by sa podľa možnosti mala odložiť, kým sa nenadobudne dostatočná istota, že zvieratá, ktoré boli exponované skôr, prežijú. To umožní vedúcemu štúdie, aby prispôsobil cieľovú koncentráciu a intervaly pre ďalšie kolo expozície.

([d]) Minimálna dávka (koncentrácia × čas), ktorá mala za následok mortalitu počas testovania pri počiatočnej koncentrácii (prvé kolo expozície), bude smerodajná pri stanovení ďalšej kombinácie koncentrácie a časových intervalov. Koncentrácia sa zvyčajne zníži na polovicu (1/2L) a zvieratá budú exponované v priebehu nového časového obdobia pri hustejšej súradnicovej sieti s využitím geometrického delenia intervalov expozície faktorom 1,4 (√2; pozri odkaz 11) v čase podľa minimálnej letálnej dávky (čas × koncentrácia) pozorovanej počas prvej expozície. Na tomto obrázku (obrázok 1) bola v kole expozície I pozorovaná mortalita po 15 minútach; intervaly počas kola II sa teda sústredia okolo 30 minút a majú trvanie 15, 21, 30, 42 a 60 minút. Po prvých dvoch expozíciách sa dôrazne odporúča zakresliť údaje do podobného obrázka, ako je znázornený vyššie, a overiť, či funkcia závislosti medzi koncentráciou a časom zviera uhol 45 stupňov (n = 1) alebo či je funkcia závislosti medzi koncentráciou, časom a reakciou menej strmá (napr. n = 2) alebo strmšia (napr. n = 0,8). V druhom prípade sa dôrazne odporúča náležite prispôsobiť ďalšie koncentrácie a intervaly.

▼M4

Kolo expozície IV – základná štúdia

— 1 zviera z každého pohlavia na koncentráciu/časový bod, spolu desať zvierat,

— exponujte päť skupín zvierat pri vyššej koncentrácii (e) (2L) počas o niečo kratších intervalov expozície (faktor √2 s využitím odstupov, pozri obrázok 1).

Matematická úprava výsledkov protokolu C × t

11. Pri postupe C × t so štyrmi alebo piatimi expozičnými koncentráciami a piatimi intervalmi sa získa 20 alebo 25 dátových bodov. Pomocou týchto dátových bodov možno s využitím štatistickej analýzy vypočítať vzťah C × t (16):

rovnica 1:

$$Probit(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

kde C = koncentrácia; t = interval expozície, alebo

rovnica 2:

$$Reakcia = f(C^n t)$$

kde $n = b_1/b_2$.

Pomocou rovnice 1 možno vypočítať hodnotu LC_{50} pre daný časový úsek (napr. 4 hodiny, 1 hodina, 30 minút alebo akýkoľvek časový úsek v rámci testovaných období) pri P = 5 (50 % reakcia). Haberovo pravidlo možno použiť iba v prípade, že n = 1. Hodnotu LC_{01} možno vypočítať pri P = 2,67.

(e) V určitých prípadoch môže byť potrebné zvýšiť koncentráciu (2L) v priebehu nového časového obdobia pri hustejšej súradnicovej sieti s využitím geometrického delenia intervalov expozície faktorom 1,4 (√2) v čase podľa minimálnej letálnej úrovne koncentrácie pozorovanej počas prvej expozície. Minimálne trvanie expozície by podľa možnosti malo presiahnuť päť minút; maximálne trvanie expozície by nemalo presiahnuť osem hodín.

▼B

B.3. **AKÚTNA TOXICITA (DERMÁLNA)**

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod, časť B (A).

1.2. POJMY

Pozri všeobecný úvod, časť B (B).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Testovaná látka sa nanáša na kožu v odstupňovaných dávkach viacerým testovaným skupinám, a to jedna dávka na jednu skupinu. Nakoniec sa registrujú pozorované príznaky otravy a prípady úmrtia. Zvieratá, ktoré uhynú počas testu, ako aj zvieratá, ktoré prežijú do konca testu, sa pitvú.

Zvieratá so silnými a pretrvávajúcimi príznakmi utrpenia a bolesti sa môžu predčasne humánne usmrtiť. Látky, o ktorých je známe, že týmto spôsobom spôsobujú svojimi žieravými alebo dráždivými účinkami výrazné bolesti a utrpenie, sa nemusia testovať.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

1.6.1. **Príprava**

Pred testom sa zvieratá vo svojich pokusných klietkach aklimatizujú minimálne päť dní na experimentálne chovateľské a kŕmne podmienky. Pred začatím testu sa zdravé, mladé dospelé zvieratá randomizujú a priraďujú k jednotlivým testovaným skupinám. Asi 24 hodín pred začiatkom testu sa strihaním alebo holením odstráni na chrbte pokusných zvierat srsť. Pri strihaní alebo holení treba brať ohľad na to, aby sa nepoškodila koža zvierat, pretože by to viedlo k zmene priepustnosti. Minimálne 10 % plochy tela je potrebné pripraviť na aplikáciu testovanej látky. Ak sa použijú tuhé látky, ktoré možno prípadne rozdrviť na prášok, mala by sa testovaná látka dostatočne navlhčiť vodou alebo prípadne vhodnou pomocnou látkou, aby sa zabezpečil dobrý kontakt s kožou. Pri použití vehikula sa musí zohľadniť jeho vplyv na vnikanie testovanej látky do kože. Tekuté testované látky sa vo všeobecnosti používajú nezriedené.

1.6.2. **Podmienky skúšania**

1.6.2.1. *Pokusné zvieratá*

Môžu sa použiť dospelé potkany alebo králiky. Môžu sa používať aj iné zvieratá, ale ich použitie sa musí zdôvodniť. Je potrebné používať známe kmene pokusných zvierat. Pre každé pohlavie by nemala byť odchýlka telesnej hmotnosti zvierat daného testu na začiatku testu viac ako ± 20 % od príslušnej strednej priemernej hodnoty.

▼B

1.6.2.2. *Počet a pohlavie*

Používajte minimálne 5 zvierat pre každú koncentráciu. Mali by byť rovnakého pohlavia. Ak sa používajú samičky, nesmú byť po vrhu gravidné. Ak existujú informácie o tom, že jedno pohlavie reaguje výrazne citlivejšie, mali by sa používať zvieratá tohto pohlavia.

Poznámka: Pri testoch akútnej toxicity na zvieratách, ktoré patria k vyššiemu rádu ako hlodavce, sa berie ohľad na použitie menšieho počtu zvierat. Dávky by sa mali voliť starostlivo a veľký dôraz by sa mal klásť na to, aby sa neprekročili primerané toxické dávky. Pri takýchto testoch by sa malo zabrániť podávaniu testovanej látky v letálnych dávkach.

1.6.2.3. *Veľkosti dávok*

Počet veľkostí dávok by mal byť dostatočný, najmenej tri, a dávky by mali byť vhodne odstupňované, aby vznikli skúšobné skupiny s výrazným rozsahom toxických účinkov a mortality. Pri určovaní veľkosti dávok by sa mal zohľadňovať možný žieravý alebo dráždivý účinok. Získané údaje by mali stačiť na zobrazenie krivky o účinku dávky a tam, kde je to možné, aj na prijateľné stanovenie LD_{50}.

1.6.2.4. *Limitný test*

Môže sa vykonať limitný test s jednou jedinou dávkou minimálne 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti na jednej skupine s 5 samčekmi a 5 samičkami pri použití opísaného postupu. Ak sa zistia prípady úmrtia podmienené látkou, mal by sa uvážiť kompletný test.

1.6.2.5. *Čas pozorovania*

Čas pozorovania by mal trvať minimálne 14 dní. Nemal by však byť určený dogmaticky. Musí závisieť od druhu obrazu otravy, časového vzniku symptómov a od trvania zotavovacej fázy. Pozorovací čas sa musí predĺžiť, ak sa to ukáže nevyhnutné. Časový moment, keď vznikajú a odznievajú príznaky otravy, ich trvanie, ako aj čas smrti majú význam hlavne vtedy, ak sú poznateľné príznaky spomalenej úmrtnosti.

1.6.3. **Postup**

Zvieratá by sa mali chovať v klietkach jednotlivo. Testovaná látka sa nanáša jednotne na oblasť, ktorá zodpovedá asi 10 % plochy tela. Pri veľmi toxických látkach môže byť táto plocha menšia, avšak čo možno najväčšia plocha by mala byť pokrytá čo možno najtenšou a naj rovnomernejšou vrstvou.

Testovaná látka musí mať počas expozičnej doby 24 hodín kontakt s kožou prostredníctvom porózneho gázového obväzu a nedráždivej náplaste. Pokusná plocha sa musí okrem toho vhodným spôsobom zakryť, aby sa zafixoval a zaistil gázový obväz a testovaná látka, aby zvieratá nemohli orálne prijímať testovanú látku. Môžu sa použiť aj prostriedky na obmedzenie slobody pohybu, aby zvieratá nemohli orálne prijímať testovanú látku, úplná imobilizácia sa však neodporúča.

▼B

Po uplynutí expozičnej doby sa odstránia zvyšky testovanej látky, pokiaľ sa dá, použitím vody alebo iným vhodným postupom na čistenie kože.

Pozorovania sa systematicky zaznamenávajú. Pre každé zviera sa vyhotovujú individuálne záznamy. Prvý deň sa pozorujú zvieratá často. Minimálne raz v pracovný deň by sa malo vykonať starostlivé klinické vyšetrenie. Ostatné denné pozorovania a príslušné opatrenia majú za cieľ obmedziť stratu zvierat pre štúdiu, napr. autopsiou alebo schladením nájdených uhynutých zvierat a izoláciou alebo humánnym usmrtením slabých alebo umierajúcich zvierat.

Pozorovania obsahujú zmeny na srsti, koži, očiach, slizniciach, zmeny dýchania a krvného obehu, autonómneho a centrálneho nervového systému, ako aj somatomotoriky a správania. Mimoriadnu pozornosť treba venovať trasu, kŕčom, slineniu, hnačkám, letargii, spánku a kóme. Časový moment smrti sa musí zachytiť čo možno najpresnejšie. Zvieratá, ktoré uhynuli počas testu, a zvieratá, ktoré prežili do konca testu, sa pitvú. Všetky patologické zmeny sa musia zaprotokolovať. Ak je to potrebné, musia sa odobrať tkanivá na histopatologické vyšetrenie.

Vyhodnotenie toxicity u druhého pohlavia

Po ukončení testu so zvieratami jedného pohlavia sa podáva testovaná látka skupine minimálne s 5 zvieratami iného pohlavia, aby sa zistilo, či tieto zvieratá nereagujú citlivejšie na testovanú látku. Za určitých okolností môže byť oprávnené použitie menšieho počtu zvierat. Ak existuje dostatok dôkazov o tom, že zvieratá skúmaného pohlavia reagujú výrazne citlivejšie, možno upustiť od testu zvierat iného pohlavia.

2. **ÚDAJE**

Údaje sa zhrnú do tabuľky, z nej musí pre každú testovanú skupinu vyplývať počet zvierat na začiatku testu, čas smrti jednotlivých zvierat, počet zvierat prejavujúcich iné známky toxicity, opis toxických účinkov a sekčné nálezy. Hmotnosť jednotlivých zvierat sa stanoví a zaznamená krátko pred aplikáciou testovanej látky, potom v týždenných intervaloch a v čase smrti; zmeny hmotnosti treba stanoviť a zaznamenať, ak zvieratá prežívajú dlhšie než jeden deň. Zvieratá, ktoré boli humánnym spôsobom usmrtené kvôli utrpeniu a bolesti vyvolanej aplikovanou látkou, sa zaznamenávajú ako uhynutie vyvolané látkou. Hodnota LD_{50} sa vypočíta pomocou uznávanej metódy.

Vyhodnotenie údajov by malo, ak je to možné, zahŕňať vzťah medzi podávanou dávkou, ako aj vznik a stupeň všetkých abnormalít vrátane zmien v správaní, klinických symptómov ťažkých poškodení, zmien telesnej hmotnosti, úmrtnosti a iných toxikologických účinkov.

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

▼B

— druh zvierat, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo atď.,

— podmienky skúšania (vrátane postupu čistenia kože a druhu obväzu – okluzívny alebo neokluzívny),

— veľkosti dávky (s vehikulom, ak sa použije, a koncentrácia),

— pohlavie exponovaných zvierat,

— údaje o reakcii vo forme tabuľky, podľa pohlavia a koncentrácie (počet zvierat uhynutých a humánne usmrtených počas testu, počet zvierat prejavujúcich príznaky toxicity, počet exponovaných zvierat),

— čas smrti po aplikácii dávky, dôvody a kritériá na predčasné usmrcovanie zvierat,

— všetky pozorovania,

— hodnotu LD_{50} pre pohlavie, u ktorého bola vykonaná úplná štúdia, stanovená pre 14-dňové pozorovanie, s uvedením metódy stanovenia,

— 95 % intervalu spoľahlivosti pre LD_{50} (tam, kde je to možné),

— krivku dávok/úmrtnosti a sklon tam, kde to metóda stanovenia umožňuje,

— sekčné nálezy,

— všetky histopatologické nálezy,

— výsledky akéhokoľvek testu na iné pohlavie,

— diskusiu o výsledkoch (zvláštnu pozornosť treba venovať vplyvu, aký môže mať predčasné humánne usmrtenie zvierat počas testu na vypočítanú hodnotu LD_{50}),

— interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B (D).

4. **ODKAZY**

Pozri všeobecný úvod časť B (E).

▼M8

B.4. AKÚTNE PODRÁŽDENIE/POLEPTANIE KOŽE

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 404 (2015). Usmernenia OECD na testovanie chemikálií sa pravidelne preskúmavajú, aby sa zabezpečilo, že odzrkadľujú najaktuálnejšie vedecké poznatky. Pri preskúmaní usmernenia OECD TG 404 sa osobitná pozornosť venovala možným zlepšeniam v súvislosti s dobrými životnými podmienkami zvierat a posúdeniu všetkých existujúcich informácií o testovanej chemikálii, aby sa zabránilo zbytočnému testovaniu na laboratórnych zvieratách. Súčasťou aktualizovanej verzie usmernenia OECD TG 404 (ktoré bolo pôvodne prijaté v roku 1981 a revidované v rokoch 1992, 2002 a 2015) sú odkazy na usmerňovací dokument o integrovaných prístupoch k testovaniu a hodnoteniu (IATA) v prípade podráždenia/poleptania kože (1), v ktorom sa navrhuje modulárny prístup k testovaniu podráždenia a poleptania kože. V rámci prístupu IATA sa opisuje viacero modulov, v ktorých sú zoskupené zdroje informácií a analytické nástroje, a i) poskytuje sa usmernenie o tom, ako integrovať a používať existujúce údaje z testovania, ako aj údaje nepochádzajúce z testovania na posúdenie potenciálu chemikálií na spôsobenie podráždenia a poleptania kože a ii) navrhuje sa prístup v prípade potreby ďalšieho testovania (1). V uvedenom usmernení sa okrem toho podľa potreby odporúča v počiatočnom teste *in vivo* použiť postupne, a nie súčasne, tri testovacie náplasti na zviera.

2. Vymedzenia podráždenia a poleptania kože sú uvedené v dodatku k tejto testovacej metóde.

POČIATOČNÉ ÚVAHY

3. V záujme vedeckej spoľahlivosti a dobrých životných podmienok zvierat sa testovanie *in vivo* nemá vykonávať, pokiaľ neboli všetky dostupné údaje súvisiace s potenciálnym poleptaním/podráždením kože testovanou chemikáliou vyhodnotené v analýze váhy dôkazov, ako sa uvádza v usmerňovacom dokumente o integrovaných prístupoch k testovaniu a hodnoteniu v prípade podráždenia/poleptania kože, t. j. v rámci troch častí tohto usmernenia a príslušných modulov (1). Stručne možno uviesť, že časť 1 sa venuje existujúcim údajom v rámci siedmich modulov týkajúcich sa údajov o ľuďoch, údajov *in vivo*, údajov *in vitro*, údajov o fyzikálno-chemických vlastnostiach (napr. pH, obzvlášť silná kyslosť alebo zásaditosť) a údajom získaným z netestovacích metód. V časti 2 sa uskutočňuje analýza váhy dôkazov. Ak analýza váhy dôkazov nevedie k presvedčivým záverom, má sa uskutočniť časť 3 s dodatočným testovaním, pričom sa začína metódami *in vitro* a testovanie *in vivo* sa používa len ako posledná možnosť. Táto analýza tak zníži potrebu testovania *in vivo* na poleptanie/podráždenie kože testovanými chemikáliami, pre ktoré už existujú dostatočné dôkazy z iných štúdií k uvedeným dvom sledovaným parametrom.

PRINCÍP TESTU IN VIVO

4. Chemikália, ktorá sa má testovať, sa aplikuje v jednorazovej dávke na kožu pokusného zvieraťa; neošetrené časti kože testovaného zvieraťa slúžia ako kontrola. V stanovených intervaloch sa zistí a vyhodnotí stupeň podráždenia/poleptania a následne sa opíše, aby sa zabezpečilo kompletné posúdenie účinkov. Trvanie štúdie má byť dostatočné na posúdenie vratnosti alebo nevratnosti pozorovaných účinkov.

▼M8

5. Zvieratá vykazujúce pretrvávajúce príznaky silného utrpenia a/alebo bolesti v ktoromkoľvek štádiu testu sa humánnym spôsobom usmrtia a testovaná chemikália sa na základe toho zatriedi. Kritériá pre rozhodnutie o humánnom usmrtení moribundných a silne trpiacich zvierat sú predmetom samostatného usmerňovacieho dokumentu (2).

PRÍPRAVA NA TEST IN VIVO

Výber druhov zvierat

6. Ako laboratórne zviera sa prednostne používa králik – albín a použijú sa zdravé mladé dospelé králiky. Použitie iných druhov je potrebné zdôvodniť.

Príprava zvierat

7. Približne 24 hodín pred testom sa dôkladným ostrihaním na chrbtovej časti trupu týchto zvierat odstráni srsť. Je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa koža neodrala, a použijú sa iba zvieratá so zdravou, neporušenou kožou.

8. Niektoré druhy králikov majú miesta s hustou srsťou, ktoré sa objavujú v určitých obdobiach roka. Takéto miesta, zarastené hustou srsťou, by sa nemali používať ako miesta na testovanie.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

9. Zvieratá by sa mali umiestniť jednotlivo. Teplota miestnosti pre pokusné zvieratá má byť 20 °C (±3 °C). Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 % a pokiaľ možno, okrem obdobia počas čistenia miestnosti, by nemala prevyšovať 70 %, cieľová relatívna vlhkosť by mala byť 50 – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie možno používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

TESTOVACÍ POSTUP

Aplikácia testovanej chemikálie

10. Testovaná chemikália sa aplikuje na malú plochu (približne 6 cm^2) kože a zakryje náplasťou z gázy, ktorá sa prichytí leukoplastom, ktorý nespôsobuje podráždenie. V prípadoch, keď nie je možná priama aplikácia (napr. kvapaliny alebo niektoré pasty), sa testovaná chemikália nanesie najskôr na náplasť z gázy, ktorá sa potom aplikuje na kožu. Náplasť sa voľne prichytí, aby bola v kontakte s kožou, pomocou vhodného semiokluzívneho obväzu počas trvania expozície. Ak sa testovaná chemikália aplikuje na náplasť, pripevní sa tak, aby mala dobrý kontakt s kožou a aby testovaná chemikália bola na koži rovnomerne rozložená. Je potrebné zabrániť tomu, aby zviera dosiahlo na náplasť a aby požilo alebo vdýchlo testovanú chemikáliu.

11. Kvapalné testované chemikálie sa spravidla aplikujú neriedené. Pri testovaní tuhých látok (ktoré sa môžu v prípade potreby rozotrieť na prach) sa testovaná chemikália navlhčí malým množstvom vody (alebo v prípade potreby iným vhodným nosičom), ktoré bude dostatočné na to, aby sa zabezpečil dobrý kontakt s kožou. Ak sa použijú iné nosiče ako voda, prípadný vplyv nosiča na podráždenie kože testovanou chemikáliou má byť minimálny.

12. Po skončení expozície, ktorá trvá zvyčajne štyri hodiny, sa zvyšná testovaná chemikália odstráni podľa potreby s použitím vody alebo vhodného rozpúšťadla bez toho, aby sa pozmenila existujúca reakcia alebo integrita epidermy.

▼M8

Úroveň dávky

13. Na testované miesto sa aplikuje dávka 0,5 ml kvapaliny alebo 0,5 g tuhej látky alebo pasty.

Počiatočný test (test *in vivo* podráždenia/poleptania kože na jednom zvierati)

14. Keď sa na základe analýzy váhy dôkazov alebo predchádzajúceho testovania *in vitro* určí, že testovaná chemikália je žieravá, dráždivá alebo neklasifikovaná, zvyčajne nie je potrebné ďalšie testovanie *in vivo*. Avšak v prípadoch, keď sa považuje za odôvodnené získanie ďalších údajov, sa vykoná test *in vivo*, a to najskôr na jednom zvierati s využitím tohto prístupu. Postupne sa na zviera aplikujú najviac tri testovacie náplasti. Prvá náplasť sa odstráni po troch minútach. Ak sa nezistí závažná reakcia kože, na iné miesto sa aplikuje druhá náplasť, ktorá sa odstráni po jednej hodine. Ak zo zistení v tomto štádiu vyplýva, že je humánne, aby sa expozícia mohla predĺžiť na štyri hodiny, aplikuje sa tretia náplasť, ktorá sa odstráni po štyroch hodinách, a reakcia sa vyhodnotí.

15. Ak sa zistí žieravý účinok po ktorejkoľvek z troch postupných expozícií, test sa ihneď ukončí. Ak sa po odstránení poslednej náplasti nezistí žieravý účinok, zviera sa pozoruje 14 dní, pokiaľ sa poleptanie neprejaví skôr.

16. V tých prípadoch, keď sa neočakáva, že testovaná chemikália spôsobí poleptanie, ale môže byť dráždivá, aplikuje sa jediná náplasť jednému zvieraťu na štyri hodiny.

Potvrdzujúci test (test *in vivo* podráždenia kože na ďalších zvieratách)

17. Ak sa nezistí žieravý účinok v počiatočnom teste, dráždivá alebo negatívna reakcia sa potvrdí na maximálne dvoch ďalších zvieratách, každé s jednou náplasťou s časom expozície štyri hodiny. Ak sa v počiatočnom teste zistí dráždivý účinok, môže sa vykonať potvrdzujúci test postupným spôsobom alebo expozíciou dvoch ďalších zvierat súčasne. Vo výnimočnom prípade, keď sa neuskutoční počiatočný test, dvom alebo trom zvieratám sa môže aplikovať jediná náplasť, ktorá sa odstráni po štyroch hodinách. V prípade, keď sa použijú dve zvieratá, ak obidve vykazujú rovnakú reakciu, nie je potrebné ďalšie testovanie. V opačnom prípade sa testuje aj tretie zviera. Môže byť potrebné, aby sa nejednoznačné reakcie vyhodnotili na ďalších zvieratách.

Obdobie pozorovania

18. Dĺžka obdobia pozorovania má byť dostatočná na celkové posúdenie vratnosti zistených účinkov. Pokus je však potrebné ukončiť vždy, keď zviera vykazuje pretrvávajúce príznaky silnej bolesti alebo utrpenia. Na určenie vratnosti účinkov sa zvieratá pozorujú do 14 dní po odstránení náplastí. Ak sa vratnosť pozoruje pred uplynutím 14 dní, pokus by sa mal v tej chvíli ukončiť.

Klinické pozorovania a vyhodnotenie kožných reakcií

19. Všetky zvieratá sa vyšetria, či nemajú príznaky erytému (sčervenania kože) a edému (opuchu), a reakcie sa vyhodnotia po 60 minútach a potom po 24, 48 a 72 hodinách po odstránení náplasti. V prípade počiatočného testu na jednom zvierati sa testované miesto vyšetrí aj bezprostredne po odstránení náplasti. Kožné reakcie sa vyhodnotia a zaznamenajú podľa stupňov v tabuľke uvedenej ďalej. Ak sa po 72 hodinách vyskytne poškodenie kože, ktoré nie je možné označiť ako podráždenie alebo poleptanie, budú potrebné pozorovania až do 14. dňa, aby sa určila vratnosť účinkov. Okrem pozorovania podráždenia sa celkove opíšu a zaznamenajú všetky lokálne toxické účinky, ako je napríklad odmastenie pokožky, a všetky systémové

▼M8

nežiaduce účinky (napr. účinky na klinické toxické príznaky a telesnú hmotnosť). Na objasnenie nejednoznačných reakcií je potrebné uvažovať o vykonaní histopatologického vyšetrenia.

20. Vyhodnotenie kožných reakcií je nevyhnutne subjektívne. Na podporu zosúladenia pri vyhodnocovaní kožnej reakcie a na pomoc testovacím laboratóriám a tým, ktorí sú zainteresovaní na uskutočňovaní a interpretovaní výsledkov, zamestnanci uskutočňujúci vyšetrenia musia byť primerane vyškolení na používanie systému hodnotenia (pozri tabuľku uvedenú ďalej). Užitočnou by mohla byť ilustrovaná príručka na vyhodnotenie podráždenia kože a iných lézií (3).

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

21. Výsledky štúdie sa zhrnú v podobe tabuliek v záverečnej správe o teste a zahŕňajú všetky body uvedené v odseku 24.

Vyhodnotenie výsledkov

22. Stupne podráždenia kože sa posudzujú v súvislosti s charakterom a závažnosťou lézií a ich vratnosťou alebo nevratnosťou. Jednotlivé stupne nepredstavujú absolútne kritérium pre dráždivé vlastnosti materiálu, keďže sa hodnotia aj iné účinky testovaného materiálu. Skôr je potrebné na jednotlivé stupne nazerať ako na referenčné hodnoty, ktoré sa majú posudzovať v súvislosti s inými pozorovaniami zo štúdie.

23. Pri hodnotení dráždivých reakcií je potrebné posúdiť vratnosť poškodení kože. Keď reakcie ako alopécia (obmedzená), hyperkeratóza, hyperplázia a šupinatosť pretrvávajú do konca 14-dňového obdobia pozorovania, testovaná chemikália sa pokladá za dráždivú.

Správa o teste

24. Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Zdôvodnenie testovania in vivo:

— analýza váhy dôkazov na základe údajov z predchádzajúcich testov vrátane výsledkov stratégie postupného testovania,

— opis relevantných údajov dostupných z predchádzajúceho testovania,

— údaje získané v každom štádiu stratégie testovania,

— opis uskutočnených testov *in vitro* vrátane podrobných údajov o postupoch, získaných výsledkov s testovanými/referenčnými látkami,

— analýza váhy dôkazov pre uskutočnenie štúdie *in vivo*.

Testovaná chemikália:

— jednozložková látka: identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

▼**M8**

— viaczložková látka, zmes a látky neznámeho alebo variabilného zloženia, komplexné reakčné produkty alebo biologické materiály (UVCB): charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— zdroj, číslo šarže, ak je k dispozícii,

— prípadná úprava testovanej chemikálie/kontrolnej látky pred testovaním (napr. zahrievanie, drvenie),

— stabilita testovanej chemikálie, konečný dátum použitia alebo dátum opätovnej analýzy, ak sú známe,

— podmienky skladovania.

Nosič:

— identifikácia, koncentrácia (ak je to vhodné), použitý objem,

— zdôvodnenie výberu nosiča.

Pokusné zvieratá:

— použitý druh/kmeň, zdôvodnenie použitia iných zvierat ako králika – albína,

— počet zvierat každého pohlavia,

— hmotnosť jednotlivých zvierat na začiatku a na konci testu,

— vek na začiatku štúdie,

— zdroj zvierat, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

Podmienky testovania:

— technika prípravy miesta aplikácie náplasti,

— podrobnosti o materiáloch náplastí a postupe vykonania náplasťového testu,

— podrobnosti o príprave testovanej chemikálie, jej aplikácii a odstránení.

Výsledky:

— tabuľkové spracovanie stupňov reakcie podráždenia/poleptania pre každé zviera vo všetkých meraných časoch,

— opisy všetkých pozorovaných lézií,

— podrobný opis charakteru a stupňa zisteného podráždenia alebo poleptania a všetky histopatologické pozorovania,

— opis iných nepriaznivých lokálnych (napr. odmastenie kože) a systémových účinkov okrem podráždenia kože alebo poleptania.

▼**M8**

Diskusia k výsledkom

Záver

LITERATÚRA

(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**

Tabuľka

Vyhodnotenie Reakcií Kože

Vytvorenie erytému alebo chrasty

Žiadny erytém	0
Veľmi slabý erytém (sotva pozorovateľný	1
Jasne ohraničený erytém	2
Mierny až silný erytém	3
Výrazný erytém (tmavočervený) až vytvorenie chrasty zabraňujúcej vyhodnoteniu erytému	4

Maximálny možný stupeň: 4

Vytvorenie edému

Žiadny edém	0
Veľmi slabý edém (sotva pozorovateľný)	1
Slabý edém (okraje oblasti jasne ohraničené zreteľným opuchom)	2
Mierny edém (opuch približne 1 mm)	3
Výrazný edém (opuch viac ako 1 mm a presahujúci za oblasť expozície)	4

Maximálny možný stupeň: 4

Na objasnenie nejednoznačných reakcií sa môže vykonať histopatologické vyšetrenie.

▼**M8**

Dodatok

VYMEDZENIE POJMOV

Chemikália je látka alebo zmes.

Podráždenie kože je vznik vratného poškodenia kože po aplikácii testovanej chemikálie, a to až do štyroch hodín.

Poleptanie kože je vznik nevratného poškodenia kože; konkrétne ide o viditeľnú nekrózu cez epidermu až do dermy po aplikácii testovanej chemikálie, a to až do štyroch hodín. Pre reakcie v dôsledku poleptania sú typické vredy, krvácanie, krvavé chrasty a na konci pozorovania po 14 dňoch strata farby v dôsledku vyblednutia kože, celé plochy postihnuté alopéciou a jazvy. Na vyhodnotenie problematických lézií by sa malo uvažovať o histopatológii.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M7

B.5. AKÚTNE PODRÁŽDENIE/POLEPTANIE OKA

ÚVOD

Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 405 (2012). Usmernenia OECD na testovanie chemikálií sa pravidelne preskúmavajú, aby sa zabezpečilo, že odzrkadľujú najaktuálnejšie vedecké poznatky. Pri predchádzajúcich preskúmaniach tohto usmernenia na vykonávanie testov sa osobitná pozornosť venovala možným zlepšeniam na základe vyhodnotenia všetkých existujúcich informácií o testovanej chemikálii, aby sa zabránilo zbytočnému testovaniu na pokusných zvieratách a aby sa tým zohľadnili dobré životné podmienky zvierat. Metóda TG 405 (prijatá v roku 1981 a aktualizovaná v rokoch 1987, 2002 a 2012) zahŕňa odporúčanie, podľa ktorého by sa pred uskutočnením opísaného testu akútneho podráždenia/poleptani oka *in vivo* mala uskutočniť analýza váhy dôkazov (1) na základe existujúcich relevantných údajov. Ak nie sú k dispozícii dostačujúce údaje, podľa odporúčania by sa mali získať na základe postupného testovania (2) (3). Stratégia testovania zahŕňa vykonanie validovaných a uznaných testov *in vitro* a je uvedená ako doplnok k tejto testovacej metóde. Na účely nariadenia (ES) č. 1907/2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemikálií (REACH) ([1]) je do príslušných usmernení ECHA takisto zahrnutá integrovaná stratégia testovania (21). Testovanie na zvieratách by sa malo vykonať len vtedy, ak sa po zvážení dostupných alternatívnych metód stanoví, že je to nevyhnutné a že jeho použitie je v týchto stanovených prípadoch vhodné. V čase prípravy tejto aktualizovanej testovacej metódy existujú prípady, keď je použitie tejto testovacej metódy stále potrebné alebo vyžadované podľa niektorých regulačných rámcov.

Najnovšia aktualizácia sa zameriava najmä na použitie analgetík a anestetík bez toho, aby bola ovplyvnená základná koncepcia a štruktúra usmernenia na vykonávanie testov. ICCVAM ([2]) a nezávislý medzinárodný vedecký panel pre partnerské preskúmanie preskúmali užitočnosť a obmedzenia bežného používania lokálnych anestetík, systémových analgetík a parametrov pre humánne ukončenie postupu v priebehu bezpečnostnej štúdie očnej dráždivosti *in vivo* (12). V rámci preskúmania sa dospelo k záveru, že využívaním lokálnych anestetík a systémových analgetík by sa dalo zabrániť väčšine bolesti a ťažkostí alebo ich úplne odstrániť bez toho, aby to malo vplyv na výsledky testu, a vyslovilo sa odporúčanie, že takéto látky by sa mali vždy používať. V tejto testovacej metóde sa prihliada na uvedené preskúmanie. V priebehu *in vivo* testovania akútneho podráždenia a poleptania oka by sa mali bežne používať lokálne anestetiká, systémové analgetiká a parametre pre humánne ukončenie postupu. Výnimky z ich použitia by sa mali odôvodniť. Jemnejšie prístupy uvedené v tejto metóde výrazne zmiernia bolesť a ťažkosti zvierat alebo im zabránia vo väčšine situácií, keď je štúdia bezpečnosti prostredníctvom očného testovania *in vivo* stále potrebná.

Súčasťou vyváženého preventívneho tíšenia bolesti by malo byť i) bežné predbežné ošetrenie lokálnym anestetikom (napr. proparakaínom alebo tetrakaínom) a systémovým analgetikom (napr. buprenorfínom), ii) bežné pravidelné dávkovanie systémových analgetík (napr. buprenorfínu a meloxikamu) po ošetrení, iii) naplánované pozorovanie, monitorovanie a zaznamenávanie klinických príznakov

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 z 18. decembra 2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemikálií (REACH) a o zriadení Európskej chemickej agentúry, o zmene a doplnení smernice 1999/45/ES a o zrušení nariadenia Rady (EHS) č. 793/93 a nariadenia Komisie (ES) č. 1488/94, smernice Rady 76/769/EHS a smerníc Komisie 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES. Ú. v. EÚ L 304, 22.11.2007, s. 1.

([2]) Výbor pre overovanie alternatívnych metód „US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods“.

▼M7

bolesti a/alebo ťažkostí u zvierat a iv) naplánované pozorovanie, monitorovanie a zaznamenávanie charakteru, závažnosti a priebehu všetkých poranení oka. Ďalšie podrobnosti sú uvedené v aktualizovaných postupoch opísaných ďalej. Po podaní testovanej chemikálie by sa nemali podávať žiadne ďalšie lokálne anestetiká ani analgetiká, aby sa zabránilo interferencii so štúdiou. Analgetiká s protizápalovým účinkom (napr. meloxikam) by sa nemali aplikovať lokálne a dávky používané systémovo by nemali interferovať s účinkami na oko.

Definície sú uvedené v dodatku k testovacej metóde.

ÚVODNÉ ÚVAHY

V záujme vedeckej spoľahlivosti, ako aj dobrých životných podmienok zvierat by sa o testovaní *in vivo* nemalo uvažovať, pokiaľ analýzou váhy dôkazov neboli vyhodnotené všetky dostupné údaje súvisiace s potenciálom chemikálie vyvolať poleptanie/podráždenie oka. Medzi takéto údaje patria dôkazy z existujúcich štúdií na ľuďoch a/alebo laboratórnych zvieratách, dôkazy o schopnosti jednej alebo viacerých štrukturálne príbuzných látok alebo zmesí takýchto látok vyvolať poleptanie/podráždenie oka, informácie svedčiace o silnej kyslosti alebo zásaditosti chemikálie (4) (5) a výsledky z validovaných a uznaných testov na poleptanie kože a poleptanie/podráždenie oka *in vitro* alebo *ex vivo* (6) (13) (14) (15) (16) (17). Štúdie sa mohli uskutočniť pred analýzou váhy dôkazov alebo ako jej dôsledok.

V prípade určitých chemikálií môže takáto analýza poukazovať na potrebu *in vivo* štúdií potenciálu chemikálie vyvolať poleptanie/podráždenie oka. Vo všetkých takýchto prípadoch by sa pred uvažovaním o použití očného testu *in vivo* mala pokiaľ možno najskôr uskutočniť štúdia žieravých účinkov chemikálie na kožu *in vitro* a/alebo *in vivo*, a potom vyhodnotiť v súlade so stratégiou postupného testovania testovacou metódou B.4 (7) alebo s integrovanou stratégiou testovania uvedenou v usmernení ECHA (21).

Stratégia postupného testovania, ktorej súčasťou je vykonanie validovaných testov poleptania/podráždenia oka *in vitro* alebo *ex vivo*, je zahrnutá ako doplnok k tejto testovacej metóde, a na účely nariadenia REACH v usmernení ECHA (21). Odporúča sa, aby sa pred vykonaním testovania *in vivo* uplatnila takáto stratégia testovania. V prípade nových chemikálií sa na získanie vedecky spoľahlivých údajov o schopnosti chemikálie vyvolať poleptanie/podráždenie odporúča stratégia postupného testovania. V prípade existujúcich chemikálií s nedostatkom údajov o schopnosti chemikálie vyvolať poleptanie/podráždenie kože a oka možno uvedenú stratégiu použiť na získanie chýbajúcich údajov. Použitie odlišnej stratégie testovania alebo testovacej metódy alebo rozhodnutie nepoužiť stratégiu postupného testovania treba zdôvodniť.

PRINCÍP TESTU *IN VIVO*

Po predbežnom ošetrení systémovým analgetikom a indukcii vhodnej lokálnej anestézie sa chemikália, ktorá sa má testovať, aplikuje v jednorazovej dávke do jedného oka pokusného zvieraťa; chemikáliou neovplyvňované oko slúži ako kontrola. Stupeň podráždenia/poleptania oka sa vyhodnotí na základe hodnotenia lézií spojovky, rohovky a dúhovky, a to v špecifických intervaloch. V záujme úplného vyhodnotenia účinkov sa opíšu aj iné účinky na oko a nepriaznivé systémové účinky. Trvanie štúdie by malo byť dostatočné na posúdenie vratnosti alebo nevratnosti účinkov.

Zvieratá vykazujúce príznaky závažných ťažkostí a/alebo bolesti v ktoromkoľvek štádiu testu alebo lézie, ktoré sú zhodné s parametrami pre humánne ukončenie postupu opísanými v tejto testovacej metóde (pozri bod 26), by sa mali humánnym spôsobom usmrtiť a daná chemikália by sa mala príslušným spôsobom vyhodnotiť. Kritéria pre rozhodnutie o humánnom usmrtení moribundných a silne trpiacich zvierat sú predmetom usmerňovacieho dokumentu OECD (8).

▼M7

PRÍPRAVA NA TEST *IN VIVO*

Výber druhov

Podľa možnosti sa ako laboratórne zviera použije králik – albín a použijú sa zdravé mladé dospelé zvieratá. Použitie iných kmeňov alebo druhov by sa malo zdôvodniť.

Príprava zvierat

Obe oči každého pokusného zvieraťa predbežne vybratého na testovanie by sa mali vyšetriť počas 24 hodín pred začatím testovania. Zvieratá vykazujúce podráždenie oka, očné poruchy alebo predchádzajúce poranenie rohovky by sa nemali použiť.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

Zvieratá by sa mali umiestniť jednotlivo. V prípade králikov by teplota experimentálnej miestnosti mala byť 20 °C (± 3 °C). Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 % a pokiaľ možno, okrem obdobia počas čistenia miestnosti, by nemala prevyšovať 70 %, cieľová relatívna vlhkosť by mala byť 50 – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé so striedaním 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Malo by sa zabrániť nadmernej intenzite svetla. Na kŕmenie možno používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

POSTUP TESTOVANIA

Použitie lokálnych anestetík a systémových analgetík

Uvádzané postupy sa odporúčajú, aby sa pri štúdii bezpečnosti prostredníctvom očného testovania zabránilo bolesti a ťažkostiam alebo aby sa bolesť a utrpenie minimalizovali. Tieto postupy možno nahradiť alternatívnymi postupmi, o ktorých sa preukázalo, že aspoň tak alebo ešte lepšie bránia bolesti a ťažkostiam alebo poskytujú aspoň takú alebo ešte lepšiu úľavu od bolesti a utrpenia ako tieto postupy.

— Šesťdesiat minút pred aplikáciou testovanej chemikálie (ATC), sa podkožnou injekciou (SC) podá buprenorfín 0,01 mg/kg s cieľom zabezpečiť terapeutickú úroveň systémovej analgézie. O buprenorfíne a iných podobných opioidových analgetikách podávaných systémovo nie je známe alebo sa o nich nepredpokladá, že by menili reakcie oka (12).

— Päť minút pred ATC sa do každého oka aplikuje jedna alebo dve kvapky lokálneho očného anestetika (napr. 0,5 % proparakaín hydrochlorid alebo 0,5 % tetrakaín hydrochlorid). S cieľom zabrániť možnej interferencii so štúdiou sa odporúča lokálne anestetikum, ktoré neobsahuje konzervačné látky. Oko každého zvieraťa, ktoré nebolo ovplyvňované testovanou chemikáliou, bolo však ošetrené lokálnym anestetikom, slúži ako kontrola. Ak sa o testovanej chemikálii predpokladá, že spôsobuje značnú bolesť a ťažkosti, nemala by sa za normálnych okolností testovať *in vivo*. Ak sa však vyskytnú pochybnosti alebo je testovanie nevyhnutné, mala by sa zvážiť ďalšia aplikácia lokálneho anestetika v 5-minútových intervaloch pred ATC. Používatelia by mali vedieť, že viacnásobná aplikácia lokálnych anestetík by mohla mať za následok mierny nárast závažnosti lézií vyvolaných chemikáliou a/alebo času potrebného na ich vymiznutie.

— Osem hodín po ATC sa podkožne podá buprenorfín 0,01 mg/kg a meloxikam 0,5 mg/kg, aby sa zabezpečila nepretržitá terapeutická úroveň systémovej analgézie. Hoci žiadne údaje nenaznačujú, že by mal meloxikam pri podkožnom podávaní raz denne protizápalové účinky na oči, nemal by sa podávať skôr ako 8 hodín po ATC s cieľom zabrániť akejkoľvek možnej interakcii so štúdiou (12).

— Po uvedenom ošetrení po prvých 8 hodinách po ATC by sa mal každých 12 hodín podkožne podávať buprenorfín 0,01 mg/kg a súčasne každých 24 hodín podkožne meloxikam 0,5 mg/kg, až kým nevymiznú očné

▼M7

lézie a všetky klinické príznaky bolesti a ťažkostí. Dostupné sú analgetické prípravky s predĺženým uvoľňovaním, ktorých podávanie by sa mohlo zvážiť na zníženie frekvencie dávkovania analgetika.

— Ak preventívna analgézia a lokálna anestézia niemajú dostatočný účinok, bezprostredne po ATC by sa mala poskytnúť „záchranná“ analgézia. Ak zviera počas štúdie preukazuje známky bolesti a ťažkostí, okamžite sa mu podkožne podá „záchranná“ dávka buprenorfínu 0,03 mg/kg a ak je to potrebné, podanie sa opakuje každých 8 hodín namiesto podkožného podania 0,01 mg/kg každých 12 hodín. Každých 24 hodín by sa mal podkožne podať meloxikam 0,5 mg/kg súčasne so „záchrannou“ dávkou buprenorfínu, ale nie skôr ako 8 hodín po ATC.

Aplikácia testovanej chemikálie

Testovaná chemikália by sa mala umiestniť do spojovkového vaku jedného oka každého zvieraťa po jemnom odtiahnutí spodného viečka od očnej gule. Viečka sa potom jemne pritlačia k sebe asi na jednu sekundu, aby sa zabránilo strate materiálu. Druhé oko, ktoré nebolo ovplyvňované chemikáliou, slúži ako kontrola.

Vymývanie

Oči testovaných zvierat by sa nemali vymývať aspoň 24 hodín po instilácii testovanej chemikálie, okrem tuhých látok (pozri bod 18) a v prípade okamžitých žieravých alebo dráždivých účinkov. Po 24 hodinách možno oči vypláchnuť, ak sa to považuje za potrebné.

Použitie náhradnej skupiny zvierat na vyšetrenie vplyvu vyplachovania sa neodporúča, pokiaľ to nie je vedecky odôvodnené. Ak je náhradná skupina potrebná, mali by sa použiť dva králiky. Podmienky vyplachovania by sa mali starostlivo zdokumentovať, napr. čas vyplachovania, zloženie a teplota vyplachovacieho roztoku, trvanie, objem a rýchlosť aplikácie.

Veľkosť dávky

1. *Testovanie kvapalín*

Na testovanie kvapalín sa používa dávka 0,1 ml. Na instiláciu chemikálie priamo do oka by sa nemali použiť tlakové dávkovače aerosólu. Tekutina zo spreja by sa mala nastriekať do nádobky pred instiláciou 0,1 ml do oka.

2. *Testovanie tuhých látok*

Pri testovaní tuhých látok, pást a chemikálií, ktoré sú tvorené z častíc, by použité množstvo malo mať objem 0,1 ml alebo hmotnosť najviac 100 mg. Testovaná chemikália by sa mala pomlieť na jemný prášok. Objem tuhého materiálu by sa mal odmerať po jemnom zhutnení, napr. poklepaním nádobky na meranie. Ak testovaná tuhá chemikália nebola fyziologicky odstránená z oka pokusného zvieraťa pri prvom pozorovaní v časovom bode 1 hodina po ovplyvňovaní, oko možno vypláchnuť fyziologickým roztokom alebo destilovanou vodou.

3. *Testovanie aerosólov*

Odporúča sa, aby sa pred instiláciou do oka všetky chemikálie z tlakových dávkovačov a aerosóly vyprázdnil do nádobky. Jedinou výnimkou sú chemikálie v tlakových aerosólových nádobách, ktoré sa nedajú vystriekať a zozbierať kvôli vyparovaniu. V takýchto prípadoch by sa oko malo držať otvorené a testovaná chemikália by sa mala aplikovať do oka jednorazovým striekaním trvajúcim približne jednu sekundu zo vzdialenosti 10 cm priamo pred okom. Túto vzdialenosť možno meniť v závislosti od tlaku spreja a jeho obsahu. Pozornosť je potrebné venovať tomu, aby sa tlakom zo spreja nepoškodilo oko. Vo vhodných prípadoch môže byť potrebné posúdiť potenciál „mechanického“ poškodenia oka tlakom kvapaliny zo spreja.

▼M7

Odhad dávky z aerosólu možno urobiť simulovaním testu takto: Chemikália sa nasprejuje na navažovací papier cez otvor veľkosti oka králika nachádzajúci sa priamo pred papierom. Na základe zvýšenia hmotnosti papiera sa odhadne množstvo nasprejované do oka. V prípade prchavých chemikálií možno dávku odhadnúť tak, že sa nádobka odváži pred odstránením testovanej chemikálie a po ňom.

Počiatočný test (test podráždenia/poleptania oka *in vivo* s použitím jedného zvieraťa)

Dôrazne sa odporúča, aby sa test *in vivo* najprv uskutočnil s použitím jedného zvieraťa (pozri doplnok k tejto testovacej metóde: Stratégia postupného testovania podráždenia a poleptania oka). Pozorovania by mali umožniť stanovenie závažnosti a vratnosti pred tým, ako sa pristúpi k potvrdzujúcemu testu na druhom zvierati.

Ak z výsledkov tohto testu vyplynie, že chemikália je po použití uvedeného postupu žieravá alebo silne dráždivá pre oko, ďalšie testovanie očnej dráždivosti by sa nemalo vykonať.

Potvrdzujúci test (test podráždenia oka *in vivo* na ďalších zvieratách)

Ak sa v počiatočnom teste nezistí žieravý alebo silne dráždivý účinok, dráždivá alebo negatívna reakcia by sa mala potvrdiť na maximálne dvoch ďalších zvieratách. Ak sa dráždivý účinok zistí v počiatočnom teste, odporúča sa, aby sa potvrdzujúci test uskutočnil postupným spôsobom, naraz len na jednom zvierati, a nie súčasnou expozíciou dvoch ďalších zvierat. Ak sa na druhom zvierati prejavia žieravé alebo silne dráždivé účinky, test sa preruší. Ak sú výsledky z druhého zvieraťa dostatočné na to, aby umožnili stanovenie klasifikácie nebezpečnosti, potom nie je potrebné uskutočniť ďalšie testovanie.

Dĺžka pozorovania/Doba pozorovania/Sledované obdobie/Pozorovacie obdobie

Dĺžka pozorovania by mala byť dostatočná na úplné vyhodnotenie veľkosti/závažnosti a vratnosti/reverzibility zistených účinkov. Pokus by sa však mal ukončiť vždy, keď zviera vykazuje známky silnej bolesti alebo ťažkostí (8). Na stanovenie vratnosti účinkov by sa zvieratá za normálnych okolností mali pozorovať 21 dní po podaní testovanej chemikálie. Ak sa vratnosť pozoruje pred uplynutím 21 dní, pokus by sa mal v tej chvíli ukončiť.

Klinické pozorovania a klasifikácia reakcií oka

Oči by sa mali hodnotiť komplexne na prítomnosť alebo neprítomnosť očných lézií jednu hodinu po ATC, po ktorom nasledujú hodnotenia aspoň raz denne. Počas prvých 3 dní by sa zvieratá mali hodnotiť niekoľkokrát denne, aby sa zabezpečilo, že rozhodnutia o ukončení testu sa prijmú včas. Pokusné zvieratá by sa mali počas celého trvania štúdie pravidelne hodnotiť na prítomnosť klinických príznakov bolesti a/alebo ťažkostí (napr. opakované dotýkanie sa oka labkou alebo trenie oka, nadmerné žmurkanie, nadmerné slzenie) (9) (10) (11), a to najmenej dvakrát denne s rozostupom najmenej 6 hodín alebo v prípade potreby aj častejšie. Toto hodnotenie je potrebné, aby i) sa zvieratá náležite posúdili v záujme získania dôkazov o bolesti a ťažkostiach s cieľom prijať kvalifikované rozhodnutia o potrebe zvýšiť dávkovanie analgetík a aby ii) sa zvieratá posúdili v záujme získania dôkazov o stanovených parametroch pre humánne ukončenie postupu s cieľom prijať kvalifikované rozhodnutia o tom, či je vhodné, aby sa zvieratá humánne usmrtili, a zabezpečiť, aby sa takéto rozhodnutia prijímali včas.

▼M7

Farbenie fluoresceínom by sa malo používať pravidelne a v náležitých prípadoch by sa mala použiť biomikroskopia oka (štrbinová lampa a binokulárny stereomikroskop) (napr. pri posudzovaní hĺbky poranenia, ak je prítomná ulcerácia rohovky) ako pomôcky na detekciu a meranie poškodenia oka a s cieľom vyhodnotiť, či sú splnené stanovené kritériá týkajúce sa sledovaných parametrov v súvislosti s humánnym usmrtením. Na referenčné účely a na účely poskytnutia trvalého záznamu rozsahu poškodenia oka možno vyhotoviť digitálne fotografie pozorovaných lézií. Zvieratá by nemali byť podrobené testovaniu dlhšie, ako je potrebné, a mali by sa z neho vyradiť ihneď po získaní definitívnej informácie. Zvieratá vykazujúce silnú bolesť alebo ťažkosti by sa mali bezodkladne humánne usmrtiť a daná chemikália by sa mala príslušným spôsobom vyhodnotiť.

Humánne usmrtiť by sa mali zvieratá, ktoré po instilácii vykazujú tieto očné lézie (pozri tabuľku 1 s opisom tried lézií): perforácia rohovky alebo významná ulcerácia rohovky vrátane stafylómu; krv v prednej komore oka; zákal rohovky 4. triedy; neprítomnosť reflexu zreničky na osvit (reakcia zrenice 2. triedy), ktorá pretrváva 72 hodín; ulcerácia spojovky; nekróza spojovky alebo žmurky; alebo odlupovanie. Je to kvôli tomu, že takéto lézie sú zvyčajne nevratné. Okrem toho sa odporúča, aby sa očné lézie uvedené ďalej v texte použili ako parametre pre humánne ukončenie postupu s cieľom ukončiť štúdie pred koncom plánovaného 21-dňového pozorovania. Tieto lézie sa považujú za predpoveď silne dráždivých alebo žieravých poranení a poranení, v prípade ktorých sa do konca 21-dňového pozorovania nepredpokladá úplné zvrátenie poškodenia (úplné zotavenie): veľká hĺbka poranenia (napr. ulcerácia rohovky presahujúca povrchové vrstvy strómy), viac ako 50 % poškodenie limbusu (čo sa prejaví vyblednutím spojovkového tkaniva) a silná infekcia oka (hnisavý výtok). Za potenciálne užitočné kritérium, ktoré môže ovplyvniť klinické rozhodnutie o predčasnom ukončení štúdie, by sa mohla považovať aj kombinácia vaskularizácie povrchu rohovky (t. j. panus), oblasti sfarbenej fluoresceínom, ktorá sa podľa každodenného posudzovania časom nezmenšuje, a/alebo nedostatočnej/neexistujúcej reepitelizácie 5 dní po aplikovaní testovanej chemikálie. Uvedené nálezy však jednotlivo nepostačujú na zdôvodnenie predčasného ukončenia štúdie. Po zistení závažných účinkov na oko by sa klinické vyšetrenie malo konzultovať s ošetrujúcim veterinárnym lekárom, veterinárnym lekárom laboratórnych zvierat alebo kvalifikovaným personálom vyškoleným na identifikáciu klinických lézií s cieľom stanoviť, či si kombinácia uvedených účinkov vyžaduje predčasné ukončenie štúdie. Triedy reakcie oka (spojovky, rohovky a dúhovky) by sa mali zisťovať a zaznamenávať po 1 hodine po aplikácii testovanej chemikálie a následne po 24, 48 a 72 hodinách (tabuľka 1). Zvieratá, u ktorých sa nevytvoria žiadne lézie oka, možno usmrtiť najskôr 3 dni po instilácii. Zvieratá s léziami oka, ktoré nemajú závažný charakter, by sa mali pozorovať do ich vymiznutia alebo 21 dní, kedy štúdia ukončí. S cieľom stanoviť stav lézií a ich vratnosť alebo nevratnosť by sa mali uskutočniť a zaznamenať pozorovania aspoň v týchto časových intervaloch: po 1 hodine, 24 hodinách, 48 hodinách, 72 hodinách, 7 dňoch, 14 dňoch a 21 dňoch. Pozorovanie by sa malo vykonávať častejšie, ak je to potrebné na zistenie toho, či by sa testované zviera malo z humánnych dôvodov usmrtiť alebo by sa malo z dôvodu negatívnych výsledkov zo štúdie vylúčiť.

Pri každom vyšetrení by sa mali zaznamenať triedy lézií oka (tabuľka 1). Zaznamenať by sa mali aj všetky ďalšie lézie oka (napr. panus, sfarbenie, zmeny prednej komory oka) alebo nepriaznivé systémové účinky.

Vyšetrenie reakcií možno uľahčiť použitím binokulárnej lupy, ručnej štrbinovej lampy, biomikroskopu alebo iného vhodného prístroja. Po zaznamenaní pozorovaní po 24 hodinách možno oči ďalej vyšetriť fluoresceínom.

Klasifikácia reakcií oka je nevyhnutne subjektívna. Na podporu harmonizácie pri klasifikácii reakcií oka a na pomoc testovacím laboratóriám a tým, ktorí sú zainteresovaní na uskutočňovaní a interpretovaní pozorovaní, musí byť personál, ktorý pozorovania uskutočňuje, adekvátne vyškolený na používanie zavedeného systému hodnotenia.

▼M7

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Vyhodnotenie výsledkov

Triedy očnej dráždivosti by sa mali vyhodnocovať v súvislosti s charakterom a závažnosťou lézií a ich vratnosťou alebo nevratnosťou. Jednotlivé stupne nepredstavujú absolútne meradlo dráždivých vlastností chemikálie, keďže sa hodnotia aj iné účinky testovanej chemikálie. Skôr by sa na jednotlivé stupne malo nazerať ako na referenčné hodnoty, ktoré majú zmysel iba vtedy, ak sú doložené úplným opisom a vyhodnotením všetkých pozorovaní.

Skúšobný protokol

Skúšobný protokol by mal zahŕňať tieto informácie:

Zdôvodnenie testovania in vivo: analýza váhy dôkazov na základe údajov z predchádzajúcich testov vrátane výsledkov stratégie postupného testovania:

— opis relevantných údajov dostupných z predchádzajúceho testovania,

— údaje získané v každom štádiu stratégie testovania,

— opis uskutočnených testov *in vitro* vrátane podrobností o postupoch, výsledkoch získaných s testovanými/referenčnými chemikáliami,

— opis uskutočnenej štúdie kožnej dráždivosti/žieravosti *in vivo* vrátane získaných výsledkov,

— analýza váhy dôkazov pre uskutočnenie štúdie *in vivo*.

Testovaná chemikália:

— identifikačné údaje (napr. systematický názov, a CAS číslo, ak je k dispozícii, čistota, známe nečistoty, zdroj, číslo šarže),

— fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti (napr. pH, prchavosť, rozpustnosť, stabilita, reaktivita s vodou),

— v prípade zmesi by sa mali identifikovať komponenty vrátane identifikačných údajov zložiek (napr. chemické názvy a CAS čísla, ak sú k dispozícii) a ich koncentrácie,

— aplikovaná dávka.

Nosič:

— identifikácia, koncentrácia (ak je to vhodné), použitý objem,

— zdôvodnenie výberu nosiča.

Testované zvieratá:

— použitý druh/kmeň, zdôvodnenie použitia iných zvierat ako králika – albína,

— vek každého zvieraťa na začiatku štúdie,

— počet zvierat každého pohlavia v testovaných a kontrolných skupinách (v prípade potreby),

— hmotnosť jednotlivých zvierat na začiatku a na konci testu,

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

▼M7

Anestetiká a analgetiká:

— dávky a časy podania lokálnych anestetík a systémových analgetík,

— ak sa použije lokálne anestetikum, identifikácia, čistota, typ a prípadná interakcia s testovanou látkou.

Výsledky:

— opis metódy použitej na hodnotenie podráždenia v každom čase pozorovania (napr. ručná štrbinová lampa, biomikroskop, fluoresceín),

— tabuľkové spracovanie údajov o dráždivých/žieravých účinkoch na každé zviera v každom čase pozorovania až do vylúčenia každého zvieraťa z testu,

— slovný opis stupňa a povahy zisteného podráždenia alebo poleptania,

— opis všetkých ďalších pozorovaných lézií oka (napr. vaskularizácia, vytvorenie panusu, zrastov, sfarbenie),

— opis lokálnych a systémových nežiaducich účinkov na iné časti tela ako na oči, záznam klinických príznakov bolesti a utrpenia, digitálne fotografie a prípadné histopatologické pozorovania.

Výsledky a diskusia

Interpretácia výsledkov

Extrapolácia výsledkov štúdií očnej dráždivosti u laboratórnych zvierat na ľudí platí len v obmedzenej miere. V mnohých prípadoch je králik – albín citlivejší na látky, ktoré spôsobujú podráždenie alebo poleptanie oka, ako ľudia.

Malo by sa dbať na to, aby sa pri interpretácii údajov vylúčilo podráždenie spôsobené sekundárnou infekciou.

LITERATÚRA

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. Kapitola B.4 tejto prílohy, *akútna toxicita: podráždenie/poleptanie kože*.

▼**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. Kapitola B.40 tejto prílohy, *Poleptanie kože in vitro: test pomocou transkutánneho elektrického odporu (TER)*.

14. Kapitola B.40a tejto prílohy, *Poleptanie kože in vitro: test pomocou modelu ľudskej kože*.

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. Kapitola B.47 tejto prílohy, Testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky na zisťovanie očných žieravín a silne dráždivých látok.

17. Kapitola B.48 tejto prílohy, Testovacia metóda izolovaného kuracieho oka na zisťovanie očných žieravín a silne dráždivých látok.

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. ES (2008), nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006 (Ú. v. EÚ L 353, 31.12.2008, s. 1).

21. ECHA, Usmernenie k požiadavkám na informácie a k hodnoteniu chemickej bezpečnosti, kapitola R.7a: Usmernenia ku konkrétnemu sledovanému parametru.

    http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

Tabuľka 1

Klasifikácia očných lézií

Rohovka	Trieda
Zákal: stupeň optickej hustoty (odčítavať by sa mal v najhustejšej oblasti) (*)	
Žiadna ulcerácia ani zákal	0
Roztrúsené alebo difúzne zakalené oblasti (iné ako ľahká stratanormálneho lesku); zreteľne viditeľné detaily dúhovky	1
Ľahko rozoznateľná priesvitná oblasť; detaily dúhovky mierne nejasné	2
Perleťová oblasť; detaily dúhovky nie sú viditeľné veľkosť zreničky ťažko rozoznateľná	3
Zakalená rohovka; dúhovka nie je rozoznateľná cez zákal	4
Maximálne možný: 4	
Dúhovka	
Normálna	0
Výrazné zvráskavenie, prekrvenie, opuch, mierna cirkumkorneálna hyperémia alebo nastrieknutie ciev; dúhovka reaguje na svetlo (pomalá reakcia sa pokladá za účinok)	1
Krvácanie, výrazné poškodenie, alebo bez reakcie na svetlo	2
Maximálne možný: 2	
Spojovky	
Sčervenanie (týka sa spojovky mihalnice a spojovky očnej gule; bez rohovky a dúhovky)	
Normálne	0
Niektoré cievy prekrvené (injektované)	1
Difúzne, karmínovočervené sfarbenie, jednotlivé cievy nie sú ľahko rozoznateľné	2
Difúzne krvavočervené	3
Maximálne možný: 3	
Chemóza	
Opuch (týka sa viečok a/alebo žmurky)	
Normálna	0
Trochu opuchnuté nad normálom	1
Zreteľný opuch s čiastočným vyvrátením viečok	2
Opuch s približne polovičným uzavretím viečok	3
Opuch s viac ako polovičným uzavretím viečok	4
Maximálne možný: 4	

(*) Mala by sa zaznamenať oblasť zakalenia rohovky

▼M7

Dodatok

DEFINÍCIE

Tlmivá kapacita: v prípade kyslých prípravkov ide o množstvo (v g) hydroxidu sodného/100 g prípravku potrebné na dosiahnutie určitého pH. V prípade zásaditých prípravkov ide o množstvo (v g) hydroxidu sodného ekvivalentného množstvu (v g) kyseliny sírovej/100 g prípravku potrebné na dosiahnutie určitého pH (Young *et al*, 1988).

Chemikália: látka alebo zmes.

Nedráždivé chemikálie: látky, ktoré nie sú podľa EPA klasifikované ako očné dráždivé látky kategórie I, II alebo III; alebo podľa GHS ako očné dráždivé látky kategórie 1, 2, 2A alebo 2B; alebo podľa EÚ ako látky kategórie 1 alebo 2 (17) (18) (19).

Očná žieravina: a) chemikália, ktorá spôsobuje nevratné poškodenie tkaniva oka; b) chemikálie, ktoré sú podľa GHS klasifikované ako očné dráždivé látky kategórie 1, alebo podľa EPA ako očné dráždivé látky kategórie I, alebo podľa EÚ ako látky kategórie 1 (17) (18) (19).

Očná dráždivá látka: a) chemikália, ktorá spôsobuje vratné zmenu v oku; b) chemikálie, ktoré sú podľa EPA klasifikované ako očné dráždivé látky kategórie II alebo III; alebo podľa GHS ako očné dráždivé látky kategórie 2, 2A alebo 2B; alebo podľa EÚ ako látky kategórie 2 (17) (18) (19).

Očná silne dráždivá chemikália: a) chemikália, ktorá spôsobuje poškodenia tkaniva oka, ktoré nevymizne do 21 dní po aplikácii alebo spôsobí veľmi výrazné zhoršenie zraku; b) chemikálie, ktoré sú podľa GHS klasifikované ako očná dráždivá látka kategórie 1, alebo podľa EPA ako očné dráždivé látky kategórie I, alebo podľa EÚ ako látky kategórie 1 (17) (18) (19).

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje touto testovacou metódou.

Viacstupňový prístup: stratégia postupného testovania, pri ktorej sa v presne určenom poradí na každom stupni preskúmavajú všetky existujúce informácie o testovanej chemikálii postupmi analýzy váhy dôkazov s cieľom určiť, či sú k dispozícii dostatočné informácie na to, aby sa mohlo prijať rozhodnutie o klasifikácii nebezpečnosti pred tým, ako sa postúpi na ďalší stupeň. Ak testovanej chemikálii možno na základe existujúcich informácií pripísať potenciál vyvolať podráždenie, nevyžaduje sa ďalšie testovanie. Ak testovanej chemikálii nemožno na základe existujúcich informácií pripísať potenciál vyvolať podráždenie, použije sa prístup postupného testovania na zvieratách v jednotlivých stupňoch, až kým ju nebude možné jednoznačne klasifikovať.

Analýza váhy dôkazov (postup): Ako základ pre vyvodenie záveru, ktorý z jednotlivých údajov nemusí byť zrejmý, sa použijú silné a slabé stránky vyplývajúce zo zozbieraných informácií.

▼M7

DOPLNOK K TESTOVACEJ METÓDE B.5 ([1])

STRATÉGIA POSTUPNÉHO TESTOVANIA PODRÁŽDENIA A POLEPTANIA OKA

Všeobecné úvahy

Je dôležité, aby sa v záujme vedeckej spoľahlivosti a dobrých životných podmienok zvierat zabránilo používaniu zvierat v prípade, že to nie je nevyhnutné, a aby sa minimalizovalo testovanie, ktoré u zvierat potenciálne spôsobuje závažné reakcie. Pred zvažovaním použitia testovania *in vivo* by sa mali posúdiť všetky informácie o chemikálii, ktoré sú relevantné z hľadiska jej potenciálu spôsobiť podráždenie/poleptanie oka. Na účely klasifikácie testovanej látky v súvislosti s jej potenciálom spôsobiť podráždenie alebo poleptanie oka už môžu existovať dostatočné dôkazy, a teda testovanie na laboratórnych zvieratách nemusí byť potrebné. Použitie analýzy váhy dôkazov a stratégie postupného testovania preto minimalizuje potrebu testovania *in vivo*, najmä ak by chemikália pravdepodobne spôsobila silné reakcie.

Odporúča sa, aby sa na posúdenie existujúcich informácií o chemikáliách, ktoré sa týkajú podráždenia a poleptania oka, a na stanovenie potreby vykonať okrem štúdie oka *in vivo* aj ďalšie štúdie, použila analýza váhy dôkazov, ktorá by pomohla charakterizovať tento potenciál. Ak sú potrebné ďalšie štúdie, odporúča sa, aby sa na získanie príslušných experimentálnych údajov použila stratégia postupného testovania. V prípade látok, ktoré sa ešte netestovali, by sa na získanie údajov potrebných na vyhodnotenie ich potenciálu spôsobiť poleptanie/podráždenie oka, mala použiť stratégia postupného testovania. Stratégia prvotného testovania opísaná v tomto doplnku bola vypracovaná na seminári OECD (1). Následne bola potvrdená a rozšírená v publikácii Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances (Harmonizovaný integrovaný systém klasifikácie nebezpečnosti chemických látok pre ľudské zdravie a ich účinku na životné prostredie), podporená na 28. spoločnom zasadnutí Výboru pre chemikálie a Pracovnej skupiny pre chemikálie v novembri 1998 (2) a aktualizovaná skupinou expertov OECD v roku 2011.

Hoci táto stratégia testovania nie je integrálnou súčasťou testovacej metódy B.5, vyjadruje odporúčaný prístup pre určovanie vlastností spočívajúcich v podráždení/poleptaní oka. Tento prístup predstavuje osvedčený postup, ako aj etické kritérium pre testovanie očnej dráždivosti/žieravosti *in vivo*. Táto testovacia metóda poskytuje usmernenie na vykonanie testu *in vivo* a sumarizuje faktory, ktoré treba preskúmať pred zvažovaním takéhoto testu. Súčasťou stratégie postupného testovania je prístup založený na analýze váhy dôkazov slúžiaci na vyhodnocovanie existujúcich údajov o schopnosti chemikálií podráždiť/poleptať oko a viacstupňový prístup na účely vytvorenia relevantných údajov o chemikáliách, v prípade ktorých sú potrebné ďalšie štúdie, alebo sa ešte žiadne neuskutočnili. Stratégia zahŕňa najprv vykonanie validovaných a uznaných testov *in vitro* alebo *ex vivo* a potom štúdií s testovacou metódou B.4 za špecifických okolností (3)(4).

Opis stratégie postupného testovania

Pred vykonaním testov ako súčasti stratégie postupného testovania (obrázok) by sa mali vyhodnotiť všetky dostupné informácie na určenie potreby očného testovania *in vivo*. Hoci by z hodnotenia jednotlivých parametrov (napr. extrémna hodnota pH) bolo možné získať významné informácie, mal by sa posúdiť súhrn existujúcich informácií. Pri rozhodovaní na základe analýzy váhy dôkazov by sa

([1]) Na použitie integrovanej stratégie testovania podráždenia oka podľa REACH pozri aj Usmernenie ECHA k požiadavkám na informácie a k hodnoteniu chemickej bezpečnosti, kapitola R.7a: Usmernenia ku konkrétnemu sledovanému parametru http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

mali vyhodnocovať všetky relevantné údaje o účinkoch príslušnej chemikálie a jej štruktúrnych analógov a toto rozhodnutie by sa malo odôvodniť. Prednostne by sa bolo treba zamerať na existujúce údaje o účinkoch chemikálie na ľudí a zvieratá, za ktorými by mali nasledovať výsledky z testovania *in vitro* alebo *ex vivo*. Štúdie žieravých chemikálií by sa podľa možnosti nemali uskutočňovať *in vivo*. Faktory zvažované v stratégii testovania zahŕňajú:

Vyhodnotenie existujúcich údajov o účinkoch chemikálie na ľudí a/alebo zvieratá a/alebo údajov z validovaných a medzinárodne akceptovaných metód testovania in vitro (krok 1).

Existujúce údaje o účinkoch na ľudí, napr. klinické štúdie alebo štúdie expozície na pracovisku a prípadové správy a/alebo údaje z testovania zvierat zo štúdií účinkov na oči a/alebo údaje z validovaných a medzinárodne akceptovaných metód in vitro testovania očnej dráždivosti/žieravosti by sa mali posúdiť ako prvé, pretože poskytujú informácie priamo súvisiace s účinkami na oči. Potom by sa mali vyhodnotiť dostupné údaje zo štúdií na ľuďoch a/alebo zvieratách, pri ktorých sa vyšetrovala kožná dráždivosť/žieravosť, a/alebo zo štúdií *in vitro* na základe validovaných a medzinárodne akceptovaných metód týkajúcich sa poleptania kože. Do očí zvierat by sa nemali aplikovať chemikálie so známou očnou žieravosťou alebo silnou očnou dráždivosťou a obdobne by sa nemali aplikovať ani chemikálie vykazujúce žieravé alebo silne dráždivé účinky na kožu, takéto chemikálie by sa totiž mali považovať za žieravé a/alebo dráždivé aj na oči. Látky s dostatočnými dôkazmi o nežieravých a nedráždivých účinkoch z prechádzajúcich štúdií uskutočnených na očiach by sa takisto nemali testovať na očiach v štúdiách *in vivo*.

Analýza vzťahu štruktúry a účinku (SAR) (krok 2).

Ak sú k dispozícii výsledky testovania štruktúrne príbuzných chemikálií, mali by sa posúdiť. Ak je k dispozícii dostatok údajov o účinkoch štruktúrne príbuzných látok alebo zmesí takýchto látok na ľudí a/alebo zvieratá, z ktorých vyplýva ich potenciál spôsobiť poleptanie/podráždenie očí, dá sa predpokladať, že testovaná chemikália vyvolá rovnaké reakcie. V týchto prípadoch sa chemikália nemusí testovať. Negatívne údaje zo štúdií štruktúrne príbuzných látok alebo zmesí takýchto látok neposkytujú dostatočný dôkaz o nežieravých/nedráždivých účinkoch chemikálie v kontexte stratégie postupného testovania. Na identifikáciu potenciálu chemikálie vyvolať poleptanie/podráždenie kože, ako aj očí by sa mali použiť validované a uznané prístupy SAR.

Fyzikálno-chemické vlastnosti a chemická reaktivita (krok 3).

Chemikálie vykazujúce extrémne hodnoty pH ako $\leq 2{,}0$ a $\geq 11{,}5$ môžu mať silné lokálne účinky. Ak je extrémna hodnota pH základom pre identifikáciu chemikálie ako žieravej alebo dráždivej pre oko, potom možno takisto zohľadniť jej tlmivú (pufračnú) kapacitu (5)(6)(7). Ak z tlmivej kapacity vyplýva, že látka nemusí byť žieravá pre oko (t. j. chemikálie s extrémnymi hodnotami pH a nízkou tlmivou kapacitou), potom by sa malo uskutočniť ďalšie testovanie na potvrdenie tejto domnienky, pričom sa prednostne použije validovaný a uznaný test *in vitro* alebo *ex vivo* (pozri bod 10).

Posúdenie ďalších existujúcich informácií (krok 4).

Na tomto stupni by sa mali posúdiť všetky dostupné informácie o systémovej toxicite transdermálnou cestou. Mala by sa takisto zohľadniť akútna dermálna toxicita testovanej chemikálie. Ak sa testovaná chemikália prejavila ako vysokotoxická transdermálnou cestou, nemusí sa testovať na oku. Aj keď bezpodmienečne neexistuje

▼**M7**

vzťah medzi akútnou dermálnou toxicitou a očnou dráždivosťou/žieravosťou, možno predpokladať, že ak je látka vysokotoxická transdermálnou cestou, bude vykazovať vysokú toxicitu aj pri aplikácii do oka. Takéto údaje možno takisto zohľadniť medzi krokmi 2 a 3.

Posúdenie potenciálu chemikálie poleptať kožu, ak je to potrebné aj na regulačné účely (krok 5).

Najprv by sa mal vyhodnotiť potenciál chemikálie poleptať a silne podráždiť kožu v súlade s testovacou metódou B.4 (4) a sprievodným doplnkom (8) vrátane použitia validovaných a medzinárodne akceptovaných testovacích metód na poleptanie kože *in vitro* (9) (10) (11). Ak je o chemikálii známe, že spôsobuje poleptanie alebo silné podráždenie kože, možno ju takisto považovať za chemikáliu žieravú alebo silne dráždivú pre oko. Preto by sa ďalšie testovanie nemalo vyžadovať. Ak chemikália nie je žieravá alebo silne dráždivá pre kožu, mal by sa vykonať očný test *in vitro* alebo *ex vivo*.

Výsledky testov *in vitro* alebo *ex vivo* (krok 6).

Chemikálie, ktoré preukázali žieravé alebo silne dráždivé vlastnosti v testoch *in vitro* alebo *ex vivo* (12) (13), ktoré boli validované a medzinárodne uznané na špecifické posúdenie očnej žieravosti/dráždivosti, nemusia byť testované na zvieratách. Možno predpokladať, že takéto látky vyvolajú podobné závažné účinky *in vivo*. Ak validované a uznané testy *in vitro/ex vivo* nie sú k dispozícii, vynechá sa krok 6 a pristúpi sa priamo ku kroku 7.

Test *in vivo* na králikoch (kroky 7 a 8):

Očné testovanie *in vivo* by sa malo začať počiatočným testom na jednom zvierati. Ak výsledky tohto testu preukážu, že chemikália je silne dráždivá alebo žieravá pre oči, ďalšie testovanie by sa nemalo vykonať. Ak sa uvedeným testom nepreukážu žiadne žieravé alebo silne dráždivé účinky, uskutoční sa potvrdzujúci test na dvoch ďalších zvieratách. V závislosti od výsledkov potvrdzujúceho testu môžu byť potrebné ďalšie testy. [pozri testovaciu metódu B.5]

▼M7

STRATÉGIA TESTOVANIA A HODNOTENIA OČNEJ DRÁŽDIVOSTI/ŽIERAVOSTI

	Činnosť	Zistenie	Záver
1	Existujúce údaje o účinkoch chemikálie na oči ľudí a/alebo zvierat a/alebo údaje o uvedených účinkoch z validovaných a medzinárodne akceptovaných metód *in vitro*	Závažné poškodenie očí	Koncový sledovaný parameter: považuje sa za žieravú pre oči. Nie je potrebné testovanie.
		Dráždivá pre oči	Koncový sledovaný parameter: považuje sa za dráždivú pre oči. Nie je potrebné testovanie.
		Nežieravá/nedráždivá pre oči	Koncový sledovaný parameter: považuje sa za nežieravú a nedráždivú pre oči. Nevyžaduje sa ďalšie testovanie.
	Existujúce údaje o žieravých účinkoch chemikálie na kožu ľudí a/alebo zvierat a/alebo údaje o uvedených účinkoch z validovaných a medzinárodne akceptovaných metód *in vitro*	Žieravá pre kožu	Predpoklad žieravosti pre oči. Nie je potrebné testovanie.
	Existujúce údaje o silne dráždivých účinkoch chemikálie na kožu ľudí a/alebo zvierat a/alebo údaje o uvedených účinkoch z validovaných a medzinárodne akceptovaných metód *in vitro*	Silne dráždivá pre kožu	Predpoklad dráždivosti pre oči. Nie je potrebné testovanie.
	↓		
	Nie sú dostupné žiadne informácie, alebo dostupné informácie nie sú presvedčivé		
	↓		
2	Vykonajte analýzu SAR na posúdenie potenciálu poleptať/podráždiť oči	Predpoklad vážneho poškodenia očí	Predpoklad žieravosti pre oči. Nie je potrebné testovanie.
		Predpoklad podráždenia očí	Predpoklad dráždivosti pre oči. Nie je potrebné testovanie.
	Zvážte vykonanie analýzy SAR na posúdenie potenciálu poleptať kožu	Predpoklad poleptania kože	Predpoklad žieravosti pre oči. Nie je potrebné testovanie.
	↓		
	Nemožno urobiť žiadne predpoklady, alebo predpoklady nie sú presvedčivé alebo sú negatívne		
	↓		
3	Zmerajte pH (tlmivú kapacitu, ak je to relevantné)	pH ≤ 2 alebo ≥ 11,5 (s vysokou tlmivou kapacitou, ak je to relevantné)	Predpoklad žieravosti pre oči. Nie je potrebné testovanie.
	↓		
	2< pH < 11,5, alebo pH ≤ 2,0 alebo ≥ 11,5 s nízkou/žiadnou tlmivou kapacitou, ak je to relevantné		
	↓		
4	Posúďte existujúce údaje o systémovej toxicite transdermálnou cestou	Vysokotoxická pri koncentráciách, ktoré by sa testovali na oku.	Chemikália by bola príliš toxická na testovanie. Nie je potrebné testovanie.

▼M7

	Činnosť	Zistenie	Záver
	↓		
	Takáto informácia nie je dostupná alebo chemikália nie je vysokotoxická		
	↓		
5	Experimentálne posúďte potenciál poleptať kožu v súlade so stratégiou testovania v kapitole B.4 tejto prílohy, ak je to potrebné aj na regulačné účely.	Reakcia vo forme poleptania alebo silného podráždenia	Predpoklad žieravosti pre oči. Nie je potrebné ďalšie testovanie.
	↓		
	Chemikália nie je žieravá ani silne dráždivá pre kožu		
	↓		
6	Vykonajte validovaný a uznaný očný test(-y) *in vitro* alebo *ex vivo*	Žieravá alebo silne dráždivá reakcia	Predpoklad žieravosti alebo silnej dráždivosti pre oči, pod podmienkou, že vykonaný test možno použiť na určenie žieravých/silne dráždivých chemikálií, pričom predmetná chemikália patrí do oblasti uplatniteľnosti daného testu. Nie je potrebné ďalšie testovanie.
		Dráždivá reakcia	Predpoklad dráždivosti pre oči, pod podmienkou, že vykonaný test, resp. testy možno použiť na správne určenie žieravých, silne dráždivých a dráždivých chemikálií, pričom predmetná chemikália patrí do oblasti uplatniteľnosti daného testu, resp. testov. Nie je potrebné ďalšie testovanie.
		Bez dráždivej reakcie	Predpoklad nedráždivosti pre oči, pod podmienkou, že vykonaný test, resp. testy možno použiť na správnu identifikáciu nedráždivých chemikálií, na správne rozlišovanie týchto chemikálií od chemikálií, ktoré sú pre oči dráždivými, silne dráždivými alebo žieravými, pričom predmetná chemikália patrí do oblasti uplatniteľnosti daného testu. Nie je potrebné ďalšie testovanie.
	↓		
	Validovaný a uznaný očný test, resp. testy in vitro alebo ex vivo nemožno použiť na vyvodenie záveru		
	↓		

▼M7

	Činnosť	Zistenie	Záver
7	Vykonajte počiatočný test *in vivo* na oku králika s použitím jedného zvieraťa.	Závažné poškodenie očí	Považuje sa za žieravú pre oči. Nie je potrebné ďalšie testovanie.
	↓		
	Žiadne závažné poškodenie alebo žiadna reakcia		
	↓		
8	Vykonajte potvrdzujúcu skúšku s jedným alebo dvomi ďalšími zvieratami.	Žieravá alebo dráždivá	Považuje sa za žieravú alebo dráždivú pre oči. Nie je potrebné ďalšie testovanie.
		Nežieravá ani nedráždivá	Považuje sa za nedráždivú a nežieravú pre oči. Nie je potrebné ďalšie testovanie.

LITERATÚRA

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. Chapter B.4 of this Annex, Acute Dermal Irritation/Corrosion.

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. Supplement to Chapter B.4 of this Annex, A Sequential Testing Strategy for Skin Irritation and Corrosion.

9. Chapter B.40 of this Annex, *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER).

10. Chapter B.40bis of this Annex, *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test.

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. Kapitola B.47 tejto prílohy, Testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky na identifikáciu i) chemikálií vyvolávajúcich vážne poškodenie očí a ii) chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí

13. Kapitola B.48 tejto prílohy, Testovacia metóda izolovaného kuracieho oka na identifikáciu i) chemikálií vyvolávajúcich vážne poškodenie očí a ii) chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí

▼B

B.6. **PODRÁŽDENIE POKOŽKY**

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Poznámky:

Citlivosť a schopnosť testov zistiť potenciál senzibilizátorov ľudskej pokožky je považovaný v systéme klasifikácie toxicity dôležitej pre ľudské zdravie za dôležitý.

Neexistuje jednoduchá metóda testovania, ktorá by postačujúco rozpoznala všetky látky s potenciálom dráždenia ľudskej pokožky a ktorá by bola vhodná pre všetky látky.

Pri výbere testu sa berú do úvahy také faktory, ako sú fyzikálne vlastnosti látky, vrátane jej schopnosti prenikať do pokožky.

Skúšky s adjuvansom sú pravdepodobne presnejšie v predpovedi pravdepodobného senzibilizačného účinku na ľudskú pokožku ako metódy bez použitia Freundsovho kompletného adjuvansu, a preto sa im dáva prednosť.

Vyvinuli sa dva typy testov, pri ktorých sa používajú morčatá: testy s pomocnou látkou, v ktorých je alergický stav zosilňovaný rozpustením alebo suspendovaním látky v kompletnom Freundsovom adjuvanse (FCA), a testy bez pomocnej látky.

Často používaným typom adjuvansového testu je maximalizovaný test morčiat (GPMT). Hoci sa na zistenie potenciálu látky spôsobujúcej precitlivelosť pokožky používajú aj iné metódy, GPMT sa medzi adjuvansovými metódami uprednostňuje.

U väčšiny skupín chemikálií sa neadjuvansové metódy (uprednostňuje sa Buehlerov test) považujú za menej citlivé.

V určitých prípadoch môžu existovať príčiny pre výber Buehlerovho testu, v ktorom sa využíva miestne použitie namiesto intradermálneho vstrekovania využívaného maximalizovaným testom morčiat (GPMT). Pri použití Buehlerovho testu je nevyhnutné vedecké zdôvodnenie jeho použitia.

V tejto metóde je opísaný maximalizovaný test morčiat (GPMT) aj Buehlerov test. Iné metódy sa môžu použiť za predpokladu, že sú dostatočne overené a vedecky zdôvodnené.

Ak sa v screeningovom teste zistia pozitívne výsledky, látka sa navrhne ako potenciálny senzibilizátor a nie je potrebné uskutočniť ďalšie testovanie s morčatami. Ak sa v takomto teste zistia negatívne výsledky, je nutné uskutočniť test s morčatami použitím postupu opísaného v tejto testovacej metóde.

Pozri aj všeobecný úvod časť B.

▼B

1.2. DEFINÍCIE

Precitlivenosť pokožky: (alergická kontaktná dermatitída) je imunologicky sprostredkovaná kožná reakcia na látku. U človeka sú reakcie charakterizované svrbením, sčervenaním pokožky, edémami, bradavicami, vezikulami, bulami alebo ich kombináciou. U iných druhov môžu byť reakcie odlišné a môže sa spozorovať iba sčervenanie kože a edémy.

Indukcia expozície: experimentálna expozícia jedinca testovanou látkou s cieľom vyvolania precitlivelého stavu.

Doba indukcie: doba najmenej jeden týždeň nasledujúca po indukcii expozície, počas ktorej sa vyvinul precitlivelý stav.

Opakované vyvolanie reakcie expozíciou: experimentálna expozícia jedinca testovanou látkou nasledujúca po dobe indukcie. Zisťuje sa ňou, či jedinec reaguje hypersenzitívne.

1.3. ODPORÚČANÉ LÁTKY

Citlivosť a spoľahlivosť použitej experimentálnej metódy sa stanovuje každých šesť mesiacov použitím látok, u ktorých sú známe mierne účinky na precitlivenosť pokožky.

V správne riadených testoch sa očakáva u látok s miernymi účinkami na precitlivenosť pokožky prinajmenšom 30 % odozva v adjuvansovom teste a 15 % v neadjuvansovom teste.

Uprednostňujú sa nasledujúce látky:

CAS číslo	EINECS číslo	EINECS názov	Bežný názov
101-86-0	202-983-3	aldehyd kys. α-hexyl škoricovej	aldehyd kys. α-hexyl škoricovej
149-30-4	205-736-8	benzotiazol-2-tiol (merkaptobenzotiazol)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzokaín	nordkaín

Pri splnení horeuvedených kritérií sa za určitých okolností môžu použiť s primeraným zdôvodnením aj iné kontrolné látky.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Na začiatku sú testované zvieratá vystavené účinku testovanej látky intradermálnym vstrekovaním a/alebo epidermálnou aplikáciou (indukcia expozície). Nasleduje vyčkávacie obdobie perióda 10 až 14 dní (indukcia expozície), počas ktorej sa vyvíja imunitná odozva, a potom sa zvieratá vystavia účinku opakovanej dávky. U testovaných zvierat sa rozsah a stupeň reakcie pokožky pri opakovanej expozícii porovná s kontrolnými zvieratami, ktoré boli podrobené simulovanej aplikácii počas indukcie a bola na nich použitá opakovaná expozícia.

1.5. OPIS TESTOVACÍCH METÓD

Ak sa považuje za nevyhnutné odstrániť testovanú látku, uskutočňuje sa to vodou alebo vhodným rozpúšťadlom bez toho, aby sa tým zmenila už existujúca odozva, alebo aby bola porušená celistvosť pokožky.

▼B

1.5.1. *Maximalizovaný test morčiat (GPMT)*

1.5.1.1. Príprava

Mladé zdravé dospelé morčatá (albíny) sa aklimatizujú na laboratórne podmienky prinajmenšom počas 5-tich dní pred testom. Pred testom sú zvieratá náhodne pridelené do testovaných skupín. Srsť sa im v závislosti od použitej metódy ostrihá, oholí alebo chemicky depiluje. Je nutné chrániť pokožku pred obrúsením. Pred začatím testu a pri jeho ukončení sa zvieratá zvážia.

1.5.1.2. Podmienky testovania

1.5.1.2.1. Testované zvieratá

Bežne sa používajú laboratórne kmene albínov morčiat.

1.5.1.2.2. Počet a pohlavie

Používajú sa samce a/alebo samice. Ak sa používajú samice musia to byť jedinci, ktoré zatiaľ nerodili, a nie sú tehotné.

V testovanej skupine sa používa minimálne 10 zvierat a v kontrolnej skupine 5 zvierat. Ak sa použije menej ako 20 testovaných a 10 kontrolných morčiat a nie je možné dôjsť k záveru, že testovaná látka je senzibilizátor, testuje sa s dodatočnými zvieratami, pričom sa výrazne doporučuje pracovať s minimálne 20 zvieratami v testovanej skupine a 10 zvieratami v kontrolnej skupine.

1.5.1.2.3. Hladiny dávok

Koncentrácia testovanej látky pri každej indukcii expozície musí byť systematicky tolerovaná a musí byť použitá najvyššia z dávok spôsobujúcich mierne podráždenie pokožky. Pri opakovanej expozícii sa používa najvyššia dávka nespôsobujúca podráždenie. Ak je to nevyhnutné, vhodné koncentrácie sa určia pri pilotnej štúdii používajúcej dve alebo tri zvieratá. Pri aplikácii sa používa kompletný Freundsov Adjuvans (FCA).

1.5.1.3. Postup

1.5.1.3.1. Indukcia

Deň 0 – testovaná skupina

Na oblasť pleca zbaveného srsti sa použijú tri páry intradermálneho vstreknutia objemu 0,1 ml.

Vstrekovanie 1: zmes 1: 1 (v/v) FCA/voda alebo fyziologický roztok

Vstrekovanie 2: vybraná koncentrácia testovanej látky vo vhodnom nosiči

Vstrekovanie 3: vybraná koncentrácia testovanej látky zmiešaná so zmesou 1: 1 (v/v) FCA/voda alebo fyziologický roztok.

Pri 3. vstrekovaní sú rozpustné látky rozpustené vo vodnej fáze ešte pred zmiešaním s FCA. Lipofilné alebo nerozpustné látky sa suspendujú v FCA ešte pred spojením s vodnou fázou. Výsledná koncentrácia musí byť totožná s koncentráciou použitou pri 2. vstrekovaní.

▼B

Vstrekovania 1 a 2 sú prevedené blízko seba, a to čo najbližšie k hlave, zatiaľ čo vstrekovanie 3 sa prevedie kaudálnym smerom na testovanom povrchu.

Deň 0 – kontrolná skupina

Na to isté miesto ako u testovanej skupiny sa použijú tri páry intradermálneho vstreknutia objemu 0,1 ml.

Vstrekovanie 1: zmes 1: 1 (v/v) FCA/voda alebo fyziologický roztok

Vstrekovanie 2: neriedený nosič

Vstrekovanie 3: zmes 50 % v/v nosiča v zmesi 1: 1 (v/v) FCA/voda alebo fyziologický roztok.

Deň 5 – 7 – testovaná a kontrolná skupina.

V prípade látky, ktorá nedráždi pokožku, sa približne dvadsať štyri hodín pred uskutočnením indukcie pri lokálnom nanášaní testovaný povrch po ostrihaní a/alebo oholení ošetrí 0,5 ml 10 % sodnej soli sulfátu kyseliny laurovej vo vazelíne, čím sa lokálne podráždenie vyvolá.

Deň 6 – 8 – testovaná skupina

Na testovanej ploche sa opäť odstráni srsť. Filtračný papier (2 × 4 cm) zmáčaný testovanou látkou vo vhodnom nosiči sa priloží na testovaný povrch a počas 48 hodín sa udržuje s ním v kontakte pomocou nepriepustného obväzu alebo nepriepustného obalu.

Deň 6 – 8 – kontrolná skupina

Na testovanej ploche sa opäť odstráni srsť. Podobným spôsobom sa vhodný nosič priloží na testovaný povrch a počas 48 hodín sa udržuje v kontakte s ním pomocou nepriepustného obväzu alebo nepriepustného obalu.

1.5.1.3.2. Opakovaná aplikácia

Deň 20 – 22 – testovaná a kontrolná skupina

Z bokov testovaných a kontrolných zvierat sa odstráni srsť. Náplasť zmáčaná testovanou látkou sa použije na jeden bok zvierat, a ak je to potrebné, na druhý bok sa použije náplasť zmáčaná samotným nosičom. Náplasti sa počas 24 hodín udržujú v kontakte s testovaným povrchom pomocou nepriepustného obväzu alebo obalu.

1.5.1.3.3. Pozorovania a odstupňovanie odozvy: testovaná a kontrolná skupina

— približne 21 hodín po odstránení náplasti je testovaný povrch vyčistený, ostrihaný a/alebo vyholený a depilovaný, ak je to nevyhnutné,

— približne o 3 hodiny neskôr (približne 48 hodín po začatí opakovanej aplikácie) sa sleduje kožná reakcia a pozorovanie sa zaznamená podľa stupňov uvedených v dodatku,

— približne 24 hodín po tomto a druhom (72 hodín) pozorovaní sa pozorovanie uskutoční opäť a zaznamená sa.

Odporúča sa uskutočnenie slepého pokusu testovaných aj kontrolných zvierat.

Ak je potrebné potvrdiť výsledky získané opakovanou aplikáciou, uskutoční sa opätovná opakovaná aplikácia s použitím novej kontrolnej skupiny. Táto aplikácia sa prevádza približne jeden týždeň po prvej. Opätovná opakovaná aplikácia sa tiež prevádza s pôvodnou kontrolnou skupinou.

▼B

Všetky kožné reakcie a nezvyčajné nálezy, vrátane systémových reakcií, zistené pri metóde indukčnej aj opakovanej aplikácie je nutné zaznamenať podľa klasifikačnej škály Magnusson/Kligman (pozri dodatok). Pri objasňovaní nejednoznačných reakcií sa uskutočňujú ďalšie postupy, napríklad histopatologické vyšetrenie alebo meranie hrúbky zriasenia pokožky.

1.5.2. *Buehlerov test*

1.5.2.1. P r í p r a v a

Mladé zdravé dospelé morčatá (albíny) sa aklimatizujú na laboratórne podmienky prinajmenšom počas 5-tich dní pred testom. Pred testom sú zvieratá náhodne pridelené do testovaných skupín. Srsť sa im v závislosti od použitej metódy ostrihá, oholí alebo chemicky depiluje. Je nutné chrániť pokožku pred obrúsením. Pred začatím testu a pri jeho ukončení sa zvieratá zvážia.

1.5.2.2. P o d m i e n k y t e s t o v a n i a

1.5.2.2.1. Testované zvieratá

Bežne sa používajú laboratórne kmene albínov morčiat.

1.5.2.2.2. Počet a pohlavie

Používajú sa samce a/alebo samice. Ak sa používajú samice, musia to byť jedince, ktoré zatiaľ nerodili a nie sú tehotné.

V testovanej skupine sa používa minimálne 20 zvierat a v kontrolnej skupine 10 zvierat.

1.5.2.2.3. Hladiny dávok

Pri každej indukcii expozície sa používa koncentrácia testovanej látky zodpovedajúca najvyššej dávke spôsobujúcej mierne, ale nie nadmerné podráždenie pokožky. Pri opakovanej expozícii sa používa najvyššia dávka nespôsobujúca podráždenie. Ak je to nevyhnutné, vhodné koncentrácie sa určia pri pilotnej štúdii, ktorá používa dve alebo tri zvieratá.

Pre testované látky rozpustné vo vode je vhodné použiť vodu alebo zriedený roztok zmáčadla ako nosiča. U iných testovaných materiálov sa uprednostňuje pri indukčnej aplikácii 80 % etanol/voda a pri opakovanej aplikácii acetón.

1.5.2.3. P o s t u p

1.5.2.3.1. Indukcia

Deň 0 – testovaná skupina

Jeden bok je vyčistený od srsti (krátkym ostrihaním). Náplasti musia byť zmáčané testovanou látkou vo vhodnom nosiči (výber nosiča musí byť oprávnený; ak je to výhodné, môžu byť kvapalné testované látky použité neriedené).

Náplasť sa použije na testovaný povrch a počas 6 hodín sa udržuje s ním v kontakte pomocou vhodného obväzu alebo obalu.

▼B

Náplasti musia byť nepriepustné. Vhodné sú bavlnené vankúšiky buď kruhového, alebo štvorcového tvaru veľkosti približne 4 – 6 cm^2. Uprednostňuje sa zabezpečenie pohltenia použitím vhodných ochranných materiálov. Pri použití obväzovania je možné, že sa bude musieť použiť doplňujúca expozícia.

Deň 0 – kontrolná skupina

Jeden bok je vyčistený od srsti (krátkym ostrihaním). Použije sa iba nosič, a to obdobne ako pri kontrolnej skupine. Náplasť sa počas 6 hodín udržuje v kontakte s pokožkou pomocou nepriepustného obväzu alebo obalu. Ak je dokázané, že nie je nevyhnutné použiť simulovanú kontrolnú skupinu, používa sa obyčajná kontrolná skupina.

Deň 6 – 8 a 13 – 15 – testovaná a kontrolná skupina

Na tej istej testovanej ploche (ak je to potrebné, vyčistenej) toho istého boku sa používa tá istá aplikácia ako v 0. dni aj v 6. – 8. dni a aj v 13. – 15. dni.

1.5.2.3.2. Opakovaná aplikácia

Deň 27 – 29 – testovaná a kontrolná skupina

Netestovaný bok testovaných a kontrolných zvierat sa vyčistí od srsti (krátkym ostrihaním). Vhodné množstvo testovanej látky na nepriepustnom obväze alebo v obale sa použije na zadnú časť netestovaného boku testovaných a kontrolných zvierat. Používa sa maximálna koncentrácia, pri ktorej nedochádza k podráždeniu.

Ak je to vhodné, na predtým netestovanú časť boku testovaných aj kontrolných zvierat sa použije nepriepustná náplasť alebo obal s nosičom. Nepriepustná náplasť alebo obal prichytený vhodným obväzom sa udržuje v kontakte s pokožkou počas 6 hodín.

1.5.2.3.3. Pozorovania a odstupňovanie odozvy: testovaná a kontrolná skupina

— približne 21 hodín po odstránení náplasti je testovaný povrch opäť vyčistený od srsti,

— približne o 3 hodiny neskôr (asi 30 hodín po začatí opakovanej aplikácie) sa sleduje kožná reakcia a pozorovanie sa zaznamená podľa stupňov uvedených v dodatku,

— približne 24 hodín po predchádzajúcom pozorovaní (asi 54 hodín po opakovanej aplikácii) sa uskutoční ďalšie pozorovanie a opäť sa zaznamená.

Odporúča sa uskutočnenie slepého pokusu testovaných aj kontrolných zvierat.

Ak je potrebné potvrdiť výsledky získané prvou opakovanou aplikáciou, uskutoční sa druhá opakovaná aplikácia s použitím novej kontrolnej skupiny. Táto aplikácia sa prevádza približne jeden týždeň po prvej. Opätovná opakovaná aplikácia sa uskutočňuje tiež s pôvodnou kontrolnou skupinou.

▼B

Všetky kožné reakcie a nezvyčajné nálezy, vrátane systémových reakcií, zistené pri metóde indukčnej aj opakovanej aplikácii je nutné sledovať a zaznamenať podľa klasifikačnej škály Magnusson/Kligman (pozri prílohu). Pri objasňovaní nejednoznačných reakcií sa uskutočňujú ďalšie postupy, napríklad histopatologické vyšetrenie alebo meranie hrúbky zriasenia pokožky.

2. **ÚDAJE (GPMT A BUEHLER)**

Všetky údaje musia byť zhrnuté v tabuľkovej forme s každou pozorovanou reakciou podráždenia pokožky zvieraťa.

3. **SPRÁVA (GPMT A BUEHLER)**

Ak sa pred testom morčiat uskutoční screeningová skúška, je potrebné uviesť spolu s výsledkami uskutočneného testu a odporúčanými testovacími látkami aj opis alebo odkaz na screeningovú skúšku (napríklad skúška lokálnych lymfatických uzlín (LLNA), test opuchnutia ucha u myší (MEST)), vrátane podrobností o postupoch.

Správa o teste (GPMT a Buehler)

Správa o teste má obsahovať, pokiaľ je to možné, nasledujúce informácie:

Testované zvieratá:

— kmeň použitých morčiat,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky bývania, strava atď.,

— individuálne hmotnosti zvierat na začiatku testu.

Podmienky testovania:

— metódu prípravy náplastí,

— podrobnosti o materiáli náplastí a technike ich použitia pri testovaní,

— výsledky pilotnej štúdie s vyhodnotením koncentrácií použitých pri indukčnej a opakovanej aplikácii,

— podrobnosti o príprave použitej látky, o jej aplikácii a odstránení,

— zdôvodnenie výberu nosiča,

— koncentrácie nosiča a testovanej látky použité pri indukčnej a opakovanej expozícii a celkové množstvo aplikovanej látky použitej pri indukcii aj opakovanej expozícii.

Výsledky:

— zostavenie tabuliek posledných výsledkov precitlivenosti a kontrole spoľahlivosti (pozri 1.3) vrátane informácií o testovanej látke, jej koncentrácii a nosiči,

▼B

— o každom zvierati vrátane systému stupňovania dávok,

— podrobný opis povahy a stupňa pozorovaných účinkov,

— histopatologické nálezy.

Diskusia

Záver

4. **ODKAZY**

Táto metóda je obdobná OECD TG 406.

▼B

Dodatok

TABUĽKA

Klasifikačná škála pre vyhodnotenie škodlivých účinkov vyvolaných škvŕn podľa Magnusson/Kligmana

0 = žiadne viditeľné zmeny

1 = nespojitý alebo škvrnitý erytém (sčervenanie kože)

2 = stredne silný a zlievajúci sa erytém

3 = intenzívny erytém a edém

▼M4

B.7. 28-DŇOVÁ ŠTÚDIA ORÁLNEJ TOXICITY PRI HLODAVCOCH/TEST V OPAKOVANÝCH DÁVKACH

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov TG 407 (2008). Pôvodné Usmernenia na vykonávanie testov 407 boli prijaté v roku 1981. V roku 1995 bola prijatá revidovaná verzia s cieľom získať ďalšie informácie pomocou zvierat použitých v štúdii, najmä informácie o neurotoxicite and imunotoxicite.

2. Organizácia OECD v roku 1998 iniciovala aktivitu s vysokou prioritou s cieľom zrevidovať existujúce usmernenia k testovaniu a vypracovať nové usmernenia k testovaniu potenciálnych endokrinných disruptorov (8). Jednou zložkou tejto aktivity bolo aktualizovať existujúce usmernenia OECD pre „28-dňovú štúdiu orálnej toxicity pri hlodavcoch/test v opakovaných dávkach“ (TG 407) podľa parametrov vhodných na zistenie endokrinného pôsobenia testovaných chemikálií. Tento postup bol podrobený rozsiahlemu medzinárodnému programu, ktorého účelom bolo otestovať význam a vykonateľnosť ďalších parametrov, výkonnosť týchto parametrov pri chemikáliách s (anti)estrogénnym, (anti)androgénnym a (anti)tyreoidným pôsobením, intralaboratórnu a interlaboratórnu reprodukovateľnosť a vzájomnú interferenciu nových parametrov s parametrami požadovanými v predchádzajúcom usmerňovacom dokumente TG 407. Týmto spôsobom sa zozbieralo veľké množstvo údajov, ktoré sa podrobne zhodnotili v súhrnnej správe OECD (9). Táto aktualizovaná testovacia metóda B.7 (rovnocenná s TG 407) bola vypracovaná na základe skúseností a výsledkov získaných počas medzinárodného programu testovania. Táto testovacia metóda umožňuje skúmanie súvislostí medzi určitými endokrinnými účinkami a inými toxikologickými účinkami.

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

3. Pri posudzovaní a vyhodnocovaní toxických charakteristík chemikálie možno po získaní prvotných informácií o toxicite prostredníctvom testovania akútnej toxicity pomocou opakovaných dávok stanoviť orálnu toxicitu. Táto testovacia metóda je zameraná na preskúmanie účinkov na veľmi širokej škále potenciálnych cieľov toxicity. Poskytuje informácie o možnej nebezpečnosti pre zdravie, ktorá sa pravdepodobne vyskytne pri opakovanej expozícii v priebehu pomerne krátkeho časového obdobia, vrátane účinkov na nervový, imunitný a endokrinný systém. Pokiaľ ide o tieto konkrétne sledované parametre, mali by sa pomocou nej identifikovať chemikálie s neurotoxickým potenciálom, čo môže viesť k ďalšiemu dôkladnému skúmaniu tohto aspektu, a chemikálie, ktoré majú vplyv na tyreoidnú fyziológiu. Takisto pomocou nej možno získať údaje o chemikáliách, ktoré majú vplyv na samčie a/alebo samičie rozmnožovacie orgány pri mladých dospelých zvieratách, a možno pomocou nej zistiť imunologické účinky.

4. Výsledky tejto testovacej metódy B.7 sa použijú na identifikáciu nebezpečnosti a na hodnotenie rizík. Výsledky získané pomocou parametrov súvisiacich s endokrinným systémom by sa mali posudzovať v kontexte Koncepčného rámca OECD na testovanie a hodnotenie chemikálií poškodzujúcich endokrinný systém (11). Metóda zahŕňa základnú štúdiu toxicity pri opakovaných dávkach, ktorú možno použiť v prípade chemikálií, pri ktorých nemožno zaručiť 90-dňovú štúdiu (napr. keď objem produkcie neprekračuje určité limity), alebo ako predbežnú štúdiu k dlhodobej štúdii. Interval expozície trvá 28 dní.

▼M4

5. Medzinárodný program uskutočnený na overenie parametrov vhodných na potenciálne odhalenie endokrinného pôsobenia testovanej chemikálie, ukázal, že kvalita údajov získaných touto testovacou metódou B.7 bude vo veľkej miere závisieť od skúseností testovacieho laboratória. Súvisí to najmä s histopatologickým stanovením cyklických zmien pri samičích rozmnožovacích orgánoch a so stanovením hmotnosti malých hormonálnych orgánov, ktorých pitva je náročná. Boli vypracované usmernenia k histopatológii (19), ktoré sú k dispozícii na verejnej webovej stránke OECD o usmerneniach k testovaniu. Ich cieľom je pomôcť patológom pri ich skúmaní a pomôcť zvýšiť citlivosť skúšky. Pri množstve parametrov sa zistilo, že indikujú endokrinnú toxicitu, na základe čoho boli začlenené do testovacej metódy. Parametre, pre ktoré nie sú k dispozícii dostatočné údaje na preukázanie ich užitočnosti alebo pri ktorých bol v rámci programu overovania preukázaný iba slabý prínos pri zisťovaní endokrinných disruptorov, sú navrhnuté ako nepovinné parametre (pozri dodatok 2).

6. Vzhľadom na údaje získané v rámci procesu overovania treba zdôrazniť, že táto štúdia nie je dostatočne citlivá na identifikáciu všetkých látok s (anti)androgénnymi alebo (anti)estrogénnymi účinkami (9). Testovacia metóda sa nevykonáva v životnej fáze, v ktorej je endokrinný systém najcitlivejší na poškodenie. Pomocou testovacej metódy sa však v priebehu procesu overovania identifikovali látky slabo alebo silno ovplyvňujúce funkciu štítnej žľazy a látky so silným a stredne silným účinkom na endokrinný systém, ktoré pôsobia na estrogénové alebo androgénové receptory. Na druhej strane vo väčšine prípadov nebolo možné identifikovať látky s účinkami na endokrinný systém, ktorých pôsobenie na estrogénové alebo androgénové receptory je slabé. Testovaciu metódu preto nemožno charakterizovať ako skríningový test endokrinného pôsobenia.

7. Neexistenciu účinkov súvisiacich s týmito druhmi pôsobenia následne nemožno brať ako dôkaz neexistencie účinkov na endokrinný systém. Pokiaľ ide o endokrinné účinky, charakterizácia látok by preto nemala byť založená iba na výsledkoch tejto testovacej metódy, ale mala by sa použiť v rámci prístupu váhy dôkazov, ktorý zohľadňuje všetky existujúce údaje o chemikálii na účely charakterizácie potenciálneho endokrinného pôsobenia. Z tohto dôvodu by regulačné rozhodovanie o endokrinnom pôsobení (charakterizácia látky) malo byť postavené na širokom základe a nemalo by sa opierať iba o výsledky aplikácie tejto testovacej metódy.

8. Uznáva sa, že všetky postupy využívajúce zvieratá musia byť v súlade s miestnymi normami starostlivosti o zvieratá. Opisy starostlivosti a zaobchádzania uvedené ďalej predstavujú minimálne normy pre vykonávanie postupov a v prípade, že miestne predpisy sú prísnejšie, budú mať miestne predpisy prednosť. Ďalšie usmernenia k humánnemu zaobchádzaniu so zvieratami uvádza organizácia OECD (14).

9. Vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

10. Niekoľkým skupinám experimentálnych zvierat sa denne orálne podáva testovaná chemikália v odstupňovaných dávkach spôsobom, pri ktorom sa každej skupine podáva jedna dávka počas 28-dňovej periódy. Počas periódy podávania sa zvieratá pozorne pozorujú, pričom sa denne kontroluje prítomnosť znakov toxického účinku. Zvieratá, ktoré počas testu uhynú alebo sa utratia, sú následne pitvané a takisto zvieratá, ktoré prežijú, sú na záver testu utratené a podrobené pitve. 28-dňová štúdia poskytuje informácie o účinkoch orálnej expozície v opakovaných dávkach a môže poukázať na potrebu

▼M4

ďalších dlhodobejších štúdií. Takisto môže poskytnúť informácie o výbere koncentrácií na účely dlhodobejších štúdií. Údaje získané pomocou tejto testovacej metódy by mali umožniť charakterizáciu toxicity testovanej chemikálie na zistenie závislosti medzi dávkou a reakciou a na stanovenie hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL).

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

11. Uprednostňovanými hlodavcami sú potkany, aj keď sa môžu použiť aj iné hlodavce. Ak sa parametre uvedené v rámci tejto testovacej metódy B.7 skúmajú pri inom druhu hlodavcov, je potrebné uviesť podrobné odôvodnenie. Hoci z biologického hľadiska je hodnoverné, že iné druhy by reagovali na toxikanty podobným spôsobom ako potkany, použitie menších druhov môže mať za následok väčšiu variabilitu z dôvodu technických problémov pri pitve menších orgánov. V rámci medzinárodného programu overovania na zistenie endokrinných disruptorov sa použili iba potkany. Používajú sa mladé zdravé dospelé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Používajú sa samice, ktoré nikdy nevrhli mláďatá a sú negravidné. Dávkovanie sa musí začať čo najskôr po odstavení mláďat a skôr než zvieratá dovŕšia deväť týždňov. Na začiatku štúdie sú váhové odchýlky pri zvieratách minimálne a neprevyšujú ± 20 % priemernej váhy oboch pohlaví. Ak je štúdia opakovanej orálnej dávky predbežnou štúdiou dlhodobej štúdie, uprednostňuje sa používanie zvierat toho istého kmeňa a z toho istého zdroja v oboch štúdiách.

Umiestnenie a kŕmenie

12. Všetky postupy musia byť v súlade s miestnymi normami starostlivosti o laboratórne zvieratá. Teplota pokusnej miestnosti, kde sú zvieratá umiestnené, by mala byť 22 °C (± 3 °C). Aj keď by relatívna vlhkosť mala byť aspoň 30 %, a pokiaľ možno by nemala prevyšovať 70 % okrem obdobia počas čistenia miestnosti, cieľom je, aby relatívna vlhkosť dosahovala 50 – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej chemikálie, keď sa podáva týmto spôsobom. Zvieratá by mali byť umiestnené spolu v malých skupinách rovnakého pohlavia. Zvieratá možno umiestniť samostatne, ak je to vedecky opodstatnené. Pokiaľ ide o umiestnenie skupín do klietok, v jednej klietke by nemalo byť viac ako päť zvierat.

13. Krmivo treba pravidelne analyzovať, aby sa zistilo, či neobsahuje kontaminanty. Vzorka krmiva by sa mala zachovať až do dokončenia správy.

Príprava zvierat

14. Zdravé, mladé, dospelé zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy vzhľadom na ich umiestnenie. Zvieratá sa jednotlivo označia. Zvieratá sa v klietkach aklimatizujú na laboratórne podmienky najmenej päť dní pred začatím testovacej štúdie.

Príprava dávok

15. Testovaná chemikália sa podáva cez sondu priamo do žalúdka alebo v potrave alebo v pitnej vode. Metóda orálneho podávania závisí od účelu štúdie a fyzikálnych, chemických a toxikokinetických vlastností testovanej chemikálie.

▼M4

16. Ak je to potrebné, testovaná chemikália sa rozpustí alebo suspenduje vo vhodnom nosiči. Odporúča sa, aby sa vždy, keď je to možné, najskôr zvážilo použitie vodného roztoku/suspenzie, potom roztoku/suspenzie v oleji (napr. kukuričnom oleji) a nakoniec prípadného roztoku v iných nosičoch. Charakteristiky toxicity nosičov iných ako voda musia byť známe. Určí sa stabilita testovanej chemikálie v nosiči.

POSTUP

Počet zvierat a ich pohlavie

17. Na každej hladine dávkovania sa použije prinajmenšom desať zvierat (päť samíc a päť samcov). Ak je v pláne utratiť nejaké zvieratá aj počas testu, počet by mal byť zvýšený o plánovaný počet zvierat, ktoré majú byť utratené pred ukončením štúdie. Treba zvážiť použitie ďalšej satelitnej skupiny desiatich zvierat (päť z každého pohlavia) ku kontrolnej skupine a ku skupine vystavenej najvyššej dávke na účely pozorovaní reverzibility, perzistencie alebo oneskorenia toxických účinkov, a to najmenej počas 14 dní po testovaní.

Dávkovanie

18. Zvyčajne sa používajú najmenej tri testovacie skupiny a jedna kontrolná skupina, ale v prípade, že sa na základe hodnotenia ostatných údajov nepredpokladajú účinky pri dávke 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň, môže sa vykonať limitný test. Ak nie sú k dispozícii vhodné údaje, môže sa vykonať štúdia na zistenie rozsahu (zvieratá toho istého kmeňa a z toho istého zdroja), aby sa ľahšie stanovili dávky, ktoré sa použijú. So zvieratami v kontrolnej skupine sa musí zaobchádzať takisto ako so zvieratami v testovaných skupinách, s výnimkou aplikovania testovanej chemikálie. Ak sa pri podávaní testovanej chemikálie používa nosič, kontrolná skupina dostane nosič v najvyššom používanom objeme.

19. Pri výbere hladín dávok sa berú do úvahy existujúce údaje o toxicite a (toxiko-)kinetike testovanej chemikálie a príbuzných chemikálií. Najvyššia dávka sa vyberá tak, aby indukovala toxické účinky, ale nespôsobovala uhynutie zvierat alebo vážne utrpenie. Podľa toho sa vyberá aj znižujúca sa postupnosť hladín dávok s cieľom určiť závislosť reakcie od dávky a stanoviť hodnotu NOAEL pri najnižšej hladine dávky. Intervaly dávkovania s faktorom dva až štyri sú často optimálne na stanovenie klesajúceho dávkovania a pridanie štvrtej pokusnej skupiny je často vhodnejšie ako používanie veľmi veľkých intervalov (napr. viac ako faktor 10) medzi dávkami.

20. Ak sa pozoruje všeobecná toxicita (napr. zníženie telesnej hmotnosti, účinky na pečeň, srdce, pľúca alebo obličky atď.) alebo iné zmeny, ktoré nemusia byť toxickou reakciou (napr. nižší príjem potravy, zväčšenie pečene), pozorované účinky na imunitné, neurologické alebo endokrinné citlivé parametre by sa mali interpretovať opatrne.

Limitný test

21. Ak sa zistí, že test pri jednej hladine najmenej 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti za deň, alebo rovnocenné množstvo v percentách v strave alebo v pitnej vode (založené na určení telesnej hmotnosti) nespôsobil pri testovaných zvieratách žiadne toxické príznaky, a ak sa toxické účinky neočakávajú ani na základe údajov štruktúrne príbuzných chemikálií, potom sa nepovažuje za nevyhnutné uskutočniť celú štúdiu s použitím troch hladín. Výnimkou je prípad, keď expozícia človeka indikuje potrebu skúmania na vyššej hladine, a vtedy sa používa limitný test.

▼M4

Podávanie dávok

22. Zvieratám sa podá dávka testovanej chemikálie každý deň sedem dní v týždni počas 28 dní. Ak je testovaná chemikália podávaná cez sondu, musí sa to realizovať v jednej dávke pre zviera za použitia žalúdočnej trubice alebo vhodnej intubačnej kanyly. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Objem nemá byť vyšší ako 1 ml/100 g telesnej hmotnosti, okrem vodných roztokov, keď sa môže použiť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. S výnimkou dráždivých alebo žieravých chemikálií, ktoré zvyčajne pri vyšších koncentráciách spôsobia zhoršenie účinkov, variabilita v aplikovanom objeme sa minimalizuje tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem vo všetkých dávkach.

23. V prípade chemikálií podávaných v potrave alebo pitnej vode je dôležité zabezpečiť, aby množstvá použitej testovanej chemikálie neinterferovali s normálnou výživovou a vodnou bilanciou. Ak je testovaná chemikália podávaná v potrave, môže sa použiť buď konštantná stravná koncentrácia (ppm) alebo konštantná úroveň dávkovania s ohľadom na telesnú hmotnosť zvierat; alternatívne používanie je potrebné špecifikovať. V prípade, keď sa chemikália podáva sondou, dávka sa podáva približne v rovnaký čas každý deň a prispôsobí sa podľa potreby, aby sa zachovala stála hladina dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť. Ak sa uskutoční predbežná štúdia pri opakovaných dávkach pred uskutočnením dlhodobej štúdie, je potrebné v oboch štúdiách použiť podobnú potravu.

Pozorovania

24. Pozorovanie trvá 28 dní. Zvieratá v satelitnej skupine, ktoré sa plánujú použiť pri ďalšom sledovaní, sa držia najmenej 14 dní bez akéhokoľvek podávania, aby bolo možné zistiť oneskorené toxické účinky alebo ich perzistenciu, alebo zotavenie sa po nich.

25. Najmenej raz denne je nutné uskutočniť všeobecné klinické pozorovania, najlepšie vždy v tom istom čase s ohľadom na časový vrchol očakávaných účinkov po podaní. Zaznamenáva sa zdravotný stav zvierat. Najmenej dvakrát denne si treba všímať chorobnosť a úmrtnosť zvierat.

26. Raz pred prvou expozíciou (je dovolené porovnanie jednotlivých zvierat medzi sebou) a potom najmenej raz týždenne sa uskutočňujú pri všetkých zvieratách podrobné klinické pozorovania. Uskutočňujú sa mimo domovských klietok v štandardnom priestore, pokiaľ možno, vždy v tom istom dennom čase. Musia byť pozorne zaznamenané, s použitím hodnotiaceho systému explicitne vymedzeného testovacím laboratóriom. Je potrebné zaistiť čo najmenšie zmeny testovacích podmienok a výhodné je, ak pozorovania vedie pozorovateľ, ktorý nepozná postup testovania. Medzi príznaky, ktoré je potrebné si všímať, patria zmeny na koži, srsti, očiach, sliznici, výskyt sekrécie, exkrécie a vegetatívnej aktivity (slzenie, piloerekcia, veľkosť zreničiek, nezvyčajné dýchanie), ale uvedené príznaky nie sú vyčerpávajúce. Zmeny v chôdzi, držaní tela a reakcii na zaobchádzanie, ako aj prítomnosť klonických alebo napätých pohybov, stereotypov (napr. opakované točenie sa), prílišné ošetrovanie sa alebo zvláštne správanie (napr. chôdza dozadu, sebaznetvorenie), sa takisto musia zaznamenať (2).

27. Vo štvrtom týždni expozície sa uskutočňuje určenie zmyslovej reaktivity podnecovanej odlišnými spôsobmi (2) (napríklad zvukovými, zrakovými a proprioceptívnymi podnetmi) (3) (4) (5), určenie sily zovretia (6) a určenie motorickej aktivity (7). Ďalšie podrobnosti o postupoch, ktoré môžu nasledovať, sú uvedené v príslušných odkazoch. Možno však použiť aj iné alternatívne postupy k postupom, ktoré tu boli opísané.

▼M4

28. Funkčné pozorovania v štvrtom týždni expozície sa nemusia uskutočniť, ak je štúdia uskutočňovaná ako predbežná štúdia subchronickej štúdie (90 dní). V tomto prípade sa funkčné pozorovania uskutočnia v nasledujúcej štúdii. Na druhej strane, dostupnosť údajov o funkčných pozorovaniach zo štúdie opakovanej dávky zvyšujú možnosť výberu úrovní dávkovaných v nasledujúcej subchronickej štúdii.

29. Výnimočne sa nemusia uskutočniť funkčné pozorovania ani pri skupinách, v ktorých sa inak preukážu toxické príznaky v takom rozsahu, že by mohli významne interferovať s uskutočnením funkčných testov.

30. Pri pitve možno stanoviť estrálny cyklus všetkých samíc (nepovinné) odobratím vaginálnych sterov. Tieto pozorovania poskytnú informácie o fáze estrálneho cyklu v čase utratenia a pomôžu pri histologickom hodnotení tkanív citlivých na estrogény [pozri usmernenia o histopatológii (19)].

Telesná hmotnosť a spotreba potravy/vody

31. Všetky zvieratá sa musia vážiť najmenej raz za týždeň. Meranie spotreby potravy sa robí najmenej raz za týždeň. Ak sa testovaná chemikália podáva vo vode na pitie, spotrebu vody je takisto potrebné merať aspoň raz za týždeň.

Hematológia

32. Na konci testovacieho obdobia sa uskutočňujú tieto hematologické testy: hematokrit, koncentrácia hemoglobínu, počet erytrocytov, retikulocyty, celkový a diferenciálny počet leukocytov, počet trombocytov a meranie času/potenciálu zrážanlivosti krvi. Medzi ďalšie stanovenia, ktoré sa uskutočňujú, ak testovaná chemikália alebo jej predpokladané metabolity majú oxidačné vlastnosti alebo ak existuje podozrenie, že majú oxidačné vlastnosti, patrí koncentrácia methemoglobínu a Heinzove telieska.

33. Vzorky krvi sa odoberajú zo stanoveného miesta tesne pred alebo počas postupu utratenia zvierat a uchovávajú sa za vhodných podmienok. Zvieratá sa noc pred utratením nekŕmia ([1]).

Klinická biochémia

34. Klinická biochémia skúma hlavné toxické účinky v tkanivách a najmä účinky na obličky a pečeň. Vyšetrenie sa uskutočňuje zo vzoriek krvi, ktoré sa odoberajú všetkým zvieratám tesne pred alebo počas postupu utratenia zvierat (okrem zvierat uhynutých a/alebo utratených pred dokončením štúdie). Vyšetrenie plazmy alebo séra zahŕňa sodík, draslík, glukózu, celkový cholesterol, močovinu, kreatinín, celkové proteíny a albumín, najmenej dva enzýmy indukujúce hepatocelulárne účinky (ako alanín-aminotransferáza, aspartát-aminotransferáza, alkalická fosfatáza, γ-glutamyl transpeptidáza a glutamát-dehydrogenáza) a žlčové kyseliny. Meranie ďalších enzýmov (hepatálneho alebo iného pôvodu) a bilirubínu môže za určitých okolností poskytnúť užitočné informácie.

35. Nepovinne sa nasledujúce zistenia v analýzach moču môžu vykonať počas posledného týždňa štúdie a použije sa časový zber objemu moču: vzhľad, objem, osmolalita alebo špecifická váha, pH, bielkoviny, glukóza a krv/krvné bunky.

([1]) Pri mnohých meraniach v sére a plazme, najmä glukózy, sa uprednostňuje nepodávanie potravy cez noc pred odberom. Hlavným dôvodom je zvýšenie pravdepodobnosti kolísania hodnôt ako nevyhnutný dôsledok prijímania potravy. Môže to viesť k zakrytiu jemnejších účinkov a sťaží to interpretáciu. Na druhej strane nočné postenie môže rušivo vplývať na celkový metabolizmus zvierat a čiastočne aj na štúdie výživy, a môže to rušiť aj dennú expozíciu testovanou chemikáliou. Ak sa použije nočné postenie, klinicko-biochemické vyšetrenie sa uskutočňuje po funkčných pozorovaniach v štvrtom týždni štúdie.

▼M4

36. Okrem toho by sa mali brať do úvahy aj štúdie na vyšetrovanie plazmových alebo sérových markerov v základných poškodených tkanivách. Ostatné zisťovanie je možné uskutočniť, ak poznáme vlastnosti testovanej chemikálie, ktoré môžu vplývať, alebo sa o nich predpokladá, že vplývajú na príbuzné metabolické profily zahrňujúce vápnik, fosfáty, triglyceridy, špecifické hormóny a cholínesterázu. Je ich potrebné identifikovať pre chemické látky v určitých skupinách alebo posúdiť prípad po prípade.

37. Hoci v medzinárodnom hodnotení sledovaných parametrov súvisiacich s endokrinným systémom nebolo možné jednoznačne preukázať jednoznačnú výhodu určenia hormónov štítnej žľazy (T3, T4) a TSH, je vhodné zachovať vzorky plazmy alebo séra na meranie T3, T4 a TSH (nepovinné), ak je indikovaný účinok na os hypofýza – štítna žľaza. Tieto vzorky možno na účely skladovania zmraziť na teplotu – 20 °C. Variabilitu a absolútne koncentrácie hormonálnych ukazovateľov môžu ovplyvniť tieto faktory:

— čas utratenia z dôvodu každodennej zmeny koncentrácií hormónov,

— metóda utratenia s cieľom zabrániť neprimeranému stresu pre zvieratá, ktorý môže ovplyvniť koncentrácie hormónov,

— súpravy na testovanie hormonálnych ukazovateľov, ktoré sa môžu líšiť štandardnými krivkami.

Definitívna identifikácia chemikálií s tyreoidnými účinkami je spoľahlivejšia na základe histopatologickej analýzy ako na základe hladín hormónov.

38. Vzorky plazmy špecificky určené na stanovenie hladiny hormónov sa odoberú počas porovnateľných denných časov. Odporúča sa, aby sa zohľadnilo stanovenie hladín T3, T4 a TSH ovplyvnených na základe zmien tyreoidnej histopatológie. Číselné hodnoty získané analýzou koncentrácií hormónov sa v prípade použitia rozličných komerčných testovacích súprav líšia. Následne nemusí byť možné zabezpečiť výkonnostné kritériá založené na jednotných historických údajoch. Laboratóriá by sa namiesto toho mali usilovať, aby boli kontrolné variačné koeficienty nižšie ako 25 v prípade T3 a T4 a nižšie ako 35 v prípade TSH. Všetky koncentrácie sa zaznamenajú v ng/ml.

39. Ak sú historické bazálne hodnoty nevhodné, zváži sa stanovenie premenných v oblasti hematológie a klinickej biochémie pred začatím dávkovania alebo podľa možnosti na skupine zvierat, ktoré neboli zaradené do pokusných skupín.

PATOLÓGIA

Makroskopická pitva

40. Všetky zvieratá v štúdii budú predmetom úplnej detailnej všeobecnej pitvy, ktorá zahŕňa pozorné vyšetrenie vonkajšieho povrchu tela, všetkých telesných otvorov a lebečnej, hrudnej, brušnej dutiny a ich obsahu. Pečeň, obličky, nadobličky, semenníky, nadsemenníky, prostata + semenné mechúriky s koagulačnými žľazami ako celok, týmus, slezina, mozog a srdce zo všetkých zvierat (okrem tých, ktoré chradnú, a/alebo zvierat, ktoré boli utratené pred ukončením štúdie) by sa mali pitvať na priľnavej tkanine a je potrebné čo najrýchlejšie zistiť ich mokrú hmotnosť skôr, ako pri pitve vyschnú. Orgány prostaty je nutné pitvať veľmi opatrne, aby sa zabránilo prepichnutiu semenných mechúrikov naplnených tekutinou. Semenné mechúriky a prostata sa prípadne môžu pitvať a vážiť aj po fixácii.

▼M4

41. Okrem toho sa nepovinne môžu čo najskôr, aby sa zabránilo vyschnutiu, odvážiť ďalšie dve tkanivá: párové vaječníky (mokrá váha) a maternica vrátane krčka maternice [usmernenie o odstránení a príprave maternicových tkanív na meranie hmotnosti sa uvádza v dokumente OECD TG 440 (18)].

42. Hmotnosť štítnej žľazy (nepovinné) sa môže určiť po fixácii. Úpravu je potrebné vykonať veľmi opatrne a až po fixácii, aby sa predišlo poškodeniu tkaniva. Poškodenie tkaniva by mohlo ohroziť histopatologickú analýzu.

43. Tieto tkanivá by sa mali uchovávať v čo najvhodnejšom fixačnom médiu na obidva typy tkanív a na neskoršie histopatologické vyšetrenie (pozri odsek 47): všetky makroskopické poškodenia, mozog (reprezentatívne oblasti vrátane veľkého mozgu, mozočka a mosta), miecha, oko, žalúdok, tenké a hrubé črevo (vrátane Peyerových plakov), pečeň, obličky, nadobličky, slezina, srdce, týmus, štítna žľaza, priedušnica a pľúca (uskladnené nafúknutím s fixačným prostriedkom a potom ponorením), gonády (semenníky a vaječníky), vedľajšie pohlavné orgány (maternica a krčok maternice, nadsemenníky, prostata + semenné mechúriky s koagulačnými žľazami), vagína, močový mechúr, lymfatické uzliny [okrem najbližšej odvodňovacej uzliny by sa mala odobrať ešte jedna lymfatická uzlina podľa praxe laboratória (15)], periférny nerv (sedací alebo tibiálny) podľa možnosti čo najbližšie k svalu, kostrový sval a kosť, s kostnou dreňou (prierez alebo čerstvo odobratá vzorka kostnej drene). Odporúča sa fixovať semenníky ponorením do Bouinovho alebo modifikovaného Davidsonovho fixačného prostriedku (16) (17). Obal tunica albuginea je potrebné opatrne a plytko prepichnúť ihlou na oboch stranách orgánu, aby sa umožnilo rýchle napustenie fixačným prostriedkom. Z klinických a iných nálezov môže vyplynúť potreba vyšetrenia ďalších následných tkanív. Takisto by sa mali zachovať všetky orgány, ktoré vzhľadom na známe vlastnosti testovanej chemikálie možno považovať za cieľové orgány.

44. Tieto tkanivá môžu poskytnúť cenné údaje o účinkoch na endokrinný systém: gonády (vaječníky a semenníky), vedľajšie pohlavné orgány (maternica vrátane krčka maternice, nadsemenníky, semenné mechúriky s koagulačnými žľazami, dorzolaterálna a ventrálna prostata), vagína, hypofýza, samčia prsná žľaza, štítna žľaza a nadoblička. Zmeny na samčích prsných žľazách nie sú dostatočne zdokumentované, ale tento parameter môže byť veľmi citlivý na látky s estrogénovým pôsobením. Pozorovanie orgánov/tkanív, ktoré nie sú vymenované v odseku 43, je nepovinné (pozri dodatok 2).

45. V Usmernení o histopatológii (19) sa uvádzajú ďalšie podrobnosti o pitvaní, fixácii, vykonávaní rezov a histopatológii endokrinných tkanív.

46. V rámci medzinárodného testovacieho programu boli získané dôkazy o tom, že nepatrné endokrinné účinky chemikálií s nízkou potenciou účinku na homeostázu pohlavných hormónov je možné určiť skôr na základe narušenia synchronizácie estrálneho cyklu v rôznych tkanivách a menej na základe zrejmých histopatologických zmien na samičích pohlavných orgánoch. Aj keď sa nezískal žiadny konečný dôkaz o takýchto účinkoch, pri interpretácii histopatológie vaječníkov (folikulárnych, tekálnych a granulóznych buniek), maternice, krčka maternice a vagíny sa odporúča brať do úvahy znaky možnej asynchrónnosti estrálneho cyklu. Ak sa hodnotí štádium cyklu podľa vaginálnych sterov, takisto ho možno zahrnúť do tohto porovnania.

▼M4

Histopatológia

47. Úplná histopatológia sa uskutoční na uskladnených orgánoch a tkanivách všetkých zvierat v kontrolnej skupine a v skupinách s vysokými dávkami. Tieto skúšky sa rozšíria o zvieratá zo všetkých skupín s odlišným dávkovaním, ak boli zistené zmeny v skupine s vysokými dávkami.

48. Preskúmajú sa všetky závažné poškodenia.

49. Ak boli použité satelitné skupiny, histopatológia sa vykoná na tkanivách a orgánoch, pri ktorých boli v testovaných skupinách zistené účinky.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

50. Je potrebné uviesť jednotlivé údaje. Navyše všetky údaje sa musia zhrnúť v tabuľkovej forme, pričom ukazujú pre každú testovanú skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat uhynutých počas testu alebo utratených z humánnych dôvodov, čas uhynutia alebo utratenia jednotlivých zvierat, počet zvierat, pri ktorých sa prejavili príznaky toxicity, opis pozorovaných príznakov toxicity vrátane nástupu, trvania a závažnosti toxických účinkov, počet zvierat vykazujúcich poškodenie, typy poškodení, ich závažnosť a percentuálne množstvo zvierat, pri ktorých sa prejavil daný typ poškodenia.

51. Ak je to možné, číselné výsledky sa vyhodnotia vhodnou a všeobecne akceptovateľnou štatistickou metódou. Porovnávanie účinkov podľa rozsahu dávkovania má zamedziť používaniu opakovaných t-testov. Štatistické metódy by sa mali vybrať počas prípravnej fázy štúdie.

52. Na účely kontroly kvality sa navrhuje, aby sa zozbierali historické kontrolné údaje a aby sa vypočítali variačné koeficienty pre číselné údaje, najmä pre parametre spojené s detekciou endokrinného disruptora. Tieto údaje sa môžu použiť pre porovnanie, keď sa vyhodnocujú jednotlivé štúdie.

Správa o teste

53. Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter, čistota a fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje.

Nosič (v prípade potreby):

— odôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda.

Testovacie zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.,

— hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku testu,

— odôvodnenie výberu druhu, ak je iný ako potkan.

Podmienky testovania:

— odôvodnenie voľby úrovne dávok,

— údaje o príprave testovanej chemikálie/krmiva, dosiahnutých koncentráciách, stabilite a homogenite prípravku,

▼M4

— údaje o podávaní testovanej chemikálie,

— prepočet koncentrácie testovanej chemikálie v krmive/pitnej vode (ppm) na skutočnú dávku (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), ak je to použiteľné,

— údaje o kvalite potravy a vody.

Nepovinné skúmané parametre

— zoznam nepovinných skúmaných parametrov.

Výsledky:

— telesná hmotnosť/zmeny telesnej hmotnosti,

— spotreba krmiva a spotreba vody, ak je to použiteľné,

— údaje o toxikologickej reakcii podľa pohlavia a úrovne dávky vrátane príznakov toxicity,

— povaha, závažnosť a trvanie klinických pozorovaní (s údajmi o reverzibilite),

— hodnotenie senzorickej aktivity, sily zovretia a motorickej aktivity,

— hematologické testy s významnými základnými hodnotami,

— testy klinickej biochémie s významnými základnými hodnotami,

— telesná hmotnosť pri utratení a údaje o hmotnosti orgánov,

— pitevné nálezy,

— podrobný opis všetkých histopatologických nálezov,

— absorpčné údaje, ak sú dostupné,

— štatistické spracovanie výsledkov v prípade potreby.

Rozbor výsledkov

Závery

▼M4

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Androgenicita je schopnosť chemikálie pôsobiť v organizme cicavcov ako prirodzený androgénny hormón (napr. testosterón).

Antiandrogenicita je schopnosť chemikálie potlačiť v organizme cicavcov pôsobenie prirodzeného androgénneho hormónu (napr. testosterónu).

Antiestrogenicita je schopnosť chemikálie potlačiť v organizme cicavcov pôsobenie prirodzeného estrogénového hormónu (napr. estradiol 17ß).

Antityreoidné pôsobenie je schopnosť látky potlačiť v organizme cicavcov pôsobenie prirodzeného hormónu štítnej žľazy (napr. T_3).

Dávkovanie je všeobecný pojem zahŕňajúci dávku látky, jej frekvenciu a trvanie podávania dávok.

Dávka je množstvo podanej testovanej chemikálie. Dávka je vyjadrená ako hmotnosť testovanej chemikálie na jednotku telesnej hmotnosti testovaného zvieraťa za deň (napr. mg/kg telesnej hmotnosti/deň) alebo ako konštantná koncentrácia v potrave.

Zjavná toxicita je všeobecný termín opisujúci jasné príznaky toxicity po podaní testovanej chemikálie. Tieto príznaky by mali postačovať na posúdenie nebezpečnosti a pri zvýšení podanej dávky by podľa nich malo byť možné predpokladať výskyt závažných príznakov toxicity a pravdepodobnej mortality.

NOAEL je skratka pre hladinu bez pozorovaného nepriaznivého účinku. Je to najvyššia úroveň dávky, pri ktorej po podaní testovanej chemikálie nie sú pozorované žiadne nepriaznivé nálezy.

Estrogenicita je schopnosť látky pôsobiť v organizme cicavcov ako prirodzený estrogénový hormón (napr. estradiol 17ß).

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Tyreoidné pôsobenie je schopnosť látky pôsobiť v organizme cicavcov ako prirodzený hormón štítnej žľazy (napr. T_3).

Validácia (overenie) je vedecký postup navrhnutý s cieľom opísať prevádzkové požiadavky a obmedzenia testovacej metódy a dokázať jej spoľahlivosť a významnosť pre konkrétny účel.

▼M4

Dodatok 2

Parametre odporúčané pre detekciu endokrinných disruptorov (ED) v rámci tejto testovacej metódy B.7

Povinné parametre	Nepovinné parametre
Hmotnosť	
— semenníky	— vaječníky
— nadsemenníky	— maternica vrátane krčka maternice
— nadobličky	— štítna žľaza
— prostata + semenné mechúriky s koagulačnými žľazami	
Histopatológia	
— gonády:	— vaginálne stery
— semenníky a	— samčie prsné žľazy
— vaječníky	— hypofýza
— vedľajšie pohlavné orgány:	
— nadsemenníky	
— prostata + semenné mechúriky s koagulačnými žľazami	
— maternica vrátane krčka maternice	
— nadoblička	
— štítna žľaza	
— vagína	
Meranie hormónov	
	— cirkulačné hladiny T3, T4
	— cirkulačné hladiny TSH

LITERATÚRA

1. OECD (Paríž, 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, D. E., Wallace, R. B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: s. 999 – 1003.

4. Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: s. 691 – 704.

5. Moser, V. C., McDaniel, 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: s. 267 – 283.

6. Meyer, O. A., Tilson, H. A., Byrd, W. C., Riley, M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: s. 233 – 236.

▼M4

7. 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: s. 599 – 609.

8. OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10. – 11. marca 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, P. W., Walker, D., Walter, G. (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: s. 404 – 407.

16. Hess, R. A., Moore, B. J. (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, s. 52 – 85.

17. Latendresse, J. R., Warbrittion, A. R., Jonassen, H., Creasy, D. M. (2002). Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, s. 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. SUBAKÚTNA INHALAČNÁ TOXICITA: 28-DŇOVÁ ŠTÚDIA

ZHRNUTIE

Táto revidovaná testovacia metóda B.8 bola vypracovaná s cieľom dôkladne opísať inhalačnú toxicitu testovanej chemikálie po opakovanej expozícii v obmedzenom časovom období (28 dní) a poskytnúť údaje pre kvantitatívne hodnotenie inhalačného rizika. Skupiny minimálne päť samcov a päť samíc hlodavcov sú na šesť hodín denne počas 28 dní exponované a) testovanej chemikálii pri troch alebo viacerých úrovniach koncentrácie; b) filtrovanému vzduchu (negatívna kontrola) a/alebo c) nosiču (kontrola pomocou nosiča). Zvieratá sú zvyčajne exponované päť dní v týždni, ale je povolená aj expozícia na sedem dní v týždni. Testujú sa vždy samce aj samice, môžu však byť vystavované rôznym úrovniam koncentrácie, ak je známe, že jedno z pohlaví je voči danej testovanej chemikálii vnímavejšie. Táto metóda poskytuje vedúcemu štúdie flexibilitu, aby mohol zahrnúť satelitné skupiny (reverzibilita), bronchoalveolárnu laváž (BAL), neurologické testy a doplnkové hodnotenia klinickej patológie a histopatologické hodnotenia s cieľom dôkladnejšie charakterizovať toxicitu testovanej chemikálie.

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov TG 412 (2009). Pôvodné usmernenia na vykonávanie testov subakútnej inhalačnej toxicity 412 (TG 412) boli prijaté v roku 1981 (1). Táto testovacia metóda B.8 (ako rovnocenná verzia revidovaných usmernení TG 412) bola aktualizovaná, aby odrážala stav vedy a spĺňala súčasné a budúce regulačné potreby.

2. Táto metóda umožňuje opísať nepriaznivé účinky po opakovanej dennej inhalačnej expozícii testovanej chemikálii počas 28 dní. Údaje odvodené z 28-dňových štúdií subakútnej inhalačnej toxicity sa môžu použiť pri kvantitatívnom hodnotení rizík [ak nenasleduje 90-dňová štúdia subchronickej inhalačnej toxicity (kapitola B.29 tejto prílohy)]. Údaje môžu takisto poskytnúť informácie o výbere koncentrácií pre dlhodobejšie štúdie, ako je napríklad 90-dňová štúdia subchronickej inhalačnej toxicity. Táto testovacia metóda nie je špecificky určená na testovanie nanomateriálov. Vymedzenie pojmov použitých v súvislosti s touto testovacou metódou je uvedené na konci tejto kapitoly a v usmerňovacom dokumente 39 (2).

ÚVODNÉ ÚVAHY

3. Pred samotným vykonaním štúdie testovacie laboratórium zváži všetky dostupné informácie o testovanej chemikálii s cieľom zlepšiť kvalitu štúdie a minimalizovať využívanie zvierat. Informácie, ktoré môžu pomôcť pri výbere vhodných testovacích koncentrácií, zahŕňajú identitu, chemickú štruktúru a fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie; výsledky všetkých testov toxicity *in vitro* alebo *in vivo*; predpokladané použitie (použitia) a potenciál pre expozíciu ľudí; dostupné údaje (Q)SAR, toxikologické údaje o štrukturálne príbuzných látkach a údaje odvodené z testov akútnej inhalačnej toxicity. Ak sa očakávajú alebo ak sa v priebehu štúdie objavia príznaky neurotoxicity, vedúci štúdie môže rozhodnúť o zahrnutí vhodných hodnotení, ako je napríklad funkčná pozorovacia batéria (FOB) a meranie motorickej aktivity. Aj keď je pri určitých testoch rozhodujúce načasovanie expozícií, tieto dodatočné činnosti nesmú narušiť základný plán štúdie.

▼M4

4. Riedenie žieravých alebo dráždivých testovaných chemikálií sa môže testovať pri koncentráciách, ktoré budú vykazovať želanú mieru toxicity [pozri dokument GD 39 (2)]. Pri vystavovaní zvierat pôsobeniu týchto materiálov musia byť cieľové koncentrácie dostatočne nízke, aby nespôsobovali výraznú bolesť ani utrpenie, a zároveň dostatočné na predĺženie krivky závislosti reakcie od koncentrácie na úroveň, na ktorej sa zabezpečí regulačný a vedecký cieľ testu. Tieto koncentrácie by sa mali vybrať v závislosti od jednotlivých prípadov, pokiaľ možno podľa vhodne navrhnutej štúdie na zistenie rozsahu, ktorá poskytuje informácie o kritickom parametri, každom prahu dráždivosti a čase nástupu príznakov (pozri odseky 11 – 13). Je potrebné zdôvodniť výber koncentrácie.

5. Moribundné zvieratá alebo zvieratá, ktoré majú očividne silné bolesti alebo vykazujú pretrvávajúce príznaky silného utrpenia, by sa mali humánnym spôsobom usmrtiť. Moribundné zvieratá sa posudzujú rovnako ako zvieratá, ktoré uhynú počas testovania. Kritériá na rozhodnutie usmrtiť moribundné alebo silne trpiace zvieratá a usmernenie o uznaní predvídateľnej alebo nastávajúcej smrti sú predmetom usmerňovacieho dokumentu OECD o humánnych parametroch (Humane Endpoints Guidance Document) (3).

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

6. Používajú sa zdravé mladé dospelé hlodavce bežne používaných laboratórnych kmeňov. Preferovaným druhom je potkan. Použitie iných druhov je potrebné zdôvodniť.

Príprava zvierat

7. Používajú sa samice, ktoré nikdy nevrhli mláďatá a sú negravidné. V deň randomizácie majú byť zvieratá mladé dospelé jedince vo veku sedem až deväť týždňov. Telesná hmotnosť má byť v rozsahu ± 20 % priemernej hmotnosti každého pohlavia. Zvieratá sú náhodne vybraté, označené tak, aby sa umožnila jednotlivá identifikácia, a držia sa v klietkach aspoň päť dní pred začiatkom testu, aby sa im umožnila aklimatizácia na laboratórne podmienky.

Chov zvierat

8. Zvieratá musia byť jednotlivo identifikované, najlepšie pomocou podkožných transpondérov, aby sa zjednodušilo pozorovanie a zamedzilo zámenám. Teplota miestnosti, kde sa pokusné zviera chová, by mala byť 22 ± 3 °C. Relatívna vlhkosť by sa v ideálnom prípade mala udržiavať v rozsahu od 30 do 70 %, hoci to nemusí byť možné, ak sa ako nosič používa voda. Pred a po expozícii sú zvieratá zvyčajne umiestnené v klietkach v skupinách podľa pohlavia a koncentrácie, ale počet zvierat v jednej klietke by nemal prekážať bezproblémovému pozorovaniu každého zvieraťa, pričom by sa mali minimalizovať straty súvisiace so vzájomným požieraním alebo bojom jedincov. V prípade, že sa použije iba expozícia oblasti nosa, môže byť potrebné, aby sa zvieratá aklimatizovali na skúmavky obmedzujúce pohyb. Obmedzujúce skúmavky by nemali zvieratám spôsobovať neprimeraný stres súvisiaci s fyzikálnymi vlastnosťami, teplotou alebo obmedzením pohybu. Obmedzenie môže mať vplyv na fyziologické sledované parametre, ako sú telesná teplota (hypertermia) a/alebo respiračný minútový objem. Ak sú k dispozícii všeobecné údaje, podľa ktorých k takýmto zmenám nedochádza vo veľkej miere, potom obmedzujúce skúmavky nie je potrebné vopred upraviť. Zvieratá vystavené účinkom aerosólu celým telom by sa mali v priebehu expozície umiestniť samostatne, aby sa zabránilo filtrovaniu testovaného aerosólu cez srsť ostatných zvierat v klietke. S výnimkou času trvania expozície sa na kŕmenie môže používať bežné a osvedčené laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou miestnej pitnej vody. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy.

▼M4

Inhalačné komory

9. Pri výbere inhalačnej komory by sa mal vziať do úvahy charakter testovanej chemikálie a predmet testu. Uprednostňuje sa expozícia oblasti nosa (pričom tento pojem zahŕňa iba expozíciu hlavy, nosa alebo pysku). Vo všeobecnosti sa pri štúdiách kvapalných alebo tuhých aerosólov a pár, ktoré môžu kondenzovať a vytvárať aerosóly, uprednostňuje expozícia oblasti nosa. Špeciálne ciele štúdie možno lepšie dosiahnuť použitím expozície celého tela, ale tento krok je potrebné v správe o štúdii odôvodniť. Na zabezpečenie stability prostredia pri používaní komory na expozíciu celého tela by celkový objem testovaných zvierat nemal presiahnuť 5 % objemu komory. Princípy metód expozície celého tela a oblasti nosa a ich konkrétne výhody a nevýhody sú opísané v dokumente GD 39 (2).

ŠTÚDIE TOXICITY

Limitné koncentrácie

10. Na rozdiel od štúdií akútnej toxicity nie sú pre 28-dňové štúdie subakútnej inhalačnej toxicity stanovené žiadne limitné koncentrácie. Pri maximálnej testovanej koncentrácii je potrebné zvážiť: 1. maximálnu dosiahnuteľnú koncentráciu; 2. najhorší možný prípad úrovne expozície ľudí; 3. potrebu zachovať primeraný prísun kyslíka a/alebo 4. otázky týkajúce sa dobrých životných podmienok zvierat. V prípade chýbajúcich limitov založených na údajoch sa môžu použiť akútne limity podľa nariadenia (ES) č. 1272/2008 (13) (t. j. až do maximálnej koncentrácie 5 mg/l v prípade aerosólov, 20 mg/l v prípade pár a 20 000 ppm v prípade plynov); pozri dokument GD 39 (2). Ak je nutné prekročiť tieto limity pri testovaní plynov alebo vysokoprchavých testovaných chemikálií (napr. chladiace látky), je potrebné uviesť odôvodnenie. Z limitnej koncentrácie by sa mala vyvodiť jednoznačná toxicita bez toho, aby sa zvieratám spôsoboval neprimeraný stres alebo aby bola ovplyvnená dĺžka ich života (3).

Štúdia na zistenie rozsahu

11. Pred začiatkom základnej štúdie môže byť potrebné vykonať štúdiu na zistenie rozsahu. Štúdia na zistenie rozsahu je komplexnejšia ako predbežná štúdia, lebo sa neobmedzuje na výber koncentrácie. Poznatky získané zo štúdie na zistenie rozsahu môžu viesť k úspešnej základnej štúdii. Štúdia na zistenie rozsahu môže napríklad poskytnúť technické informácie o analytických metódach, rozdelení veľkosti častíc, odhalení toxických mechanizmov, klinickej patológii a histopatologických údajoch a odhadoch koncentrácií NOAEL a MTC v základnej štúdii. Vedúci štúdie sa môže rozhodnúť pre štúdiu na zistenie rozsahu s cieľom identifikovať prah dráždivosti dýchacích ciest (napr. histopatológiou dýchacích ciest, testovaním fungovania pľúc alebo bronchoalveolárnou lavážou), hornú koncentráciu tolerovanú bez toho, aby spôsobovala zvieratám neprimeraný stres, a parametre, ktoré najlepšie charakterizujú toxicitu testovanej chemikálie.

12. Štúdia na zistenie rozsahu môže pozostávať z jednej alebo viacerých úrovní koncentrácie. Každej úrovni koncentrácie by mali byť vystavené nie viac ako tri samce a tri samice. Štúdia na zistenie rozsahu by mala trvať minimálne päť dní a zvyčajne nie viac ako 14 dní. V správe o štúdii sa uvedú dôvody výberu koncentrácií pre základnú štúdiu. Cieľom základnej štúdie je preukázať vzťah koncentrácie a reakcie založený na parametri, ktorý je podľa očakávaní najcitlivejší. Nízka koncentrácia by mala ideálne predstavovať koncentráciu bez pozorovaného účinku, zatiaľ čo z vysokej koncentrácie by sa mala vyvodiť jednoznačná toxicita bez toho, aby sa zvieratám spôsoboval neprimeraný stres alebo aby bola ovplyvnená dĺžka ich života (3).

▼M4

13. Pri výbere úrovní koncentrácie pre štúdiu na zistenie rozsahu je potrebné zvážiť všetky dostupné informácie vrátane vzťahov štruktúry a aktivity a údajov o podobných látkach (pozri odsek 3). Štúdia na zistenie rozsahu môže potvrdiť/vyvrátiť parametre, ktoré sa považujú za najcitlivejšie mechanisticky založené parametre, napr. cholínesterázna inhibícia prostredníctvom organofosfátov, tvorba methemoglobínu prostredníctvom erytrocytotoxických činiteľov, hormóny štítnej žľazy (T_3, T_4) v prípade látok toxických pre štítnu žľazu, proteín, LDH alebo neutrofily pri bronchoalveolárnej laváži v prípade neškodných slabo rozpustných častíc alebo aerosólov dráždivých pre pľúca.

Základná štúdia

14. Základná štúdia subakútnej toxicity vo všeobecnosti pozostáva z troch úrovní koncentrácie a podľa potreby aj zo súbežných negatívnych (vzduchových) kontrol a/alebo kontrol nosiča (pozri odsek 17). Pri výbere vhodných úrovní expozície je potrebné použiť všetky dostupné údaje vrátane výsledkov štúdií systémovej toxicity, metabolizmu a kinetiky (osobitne treba dbať na to, aby sa nepoužívali vysoké úrovne koncentrácie, ktoré nasycujú kinetické procesy). Každá testovacia skupina je zložená aspoň z desiatich hlodavcov (piatich samcov a piatich samíc), ktoré sú exponované testovanej chemikálii šesť hodín denne päť dní v týždni počas štyroch týždňov (celkové trvanie štúdie 28 dní). Zvieratá môžu byť pôsobeniu chemikálie vystavené aj sedem dní v týždni (napr. pri testovaní inhalovaných liekov). Ak je o jednom z pohlaví známe, že je voči danej testovanej chemikálii vnímavejšie, môžu byť pohlavia vystavené rôznym úrovniam koncentrácie, aby sa optimalizovala reakcia na koncentráciu podľa opisu v odseku 15. Ak sa v prípade iných hlodavcov ako potkanov použije expozícia oblasti nosa, maximálne trvanie expozície je možné prispôsobiť s cieľom minimalizovať druhovo špecifické utrpenie. Pri použití intervalu expozície v trvaní menej ako šesť hodín denne, alebo ak je potrebné vykonať štúdiu expozície celého tela s dlhým intervalom (napr. 22 hodín denne), treba uviesť odôvodnenie [pozri dokument GD 39 (2)]. Počas trvania expozície by sa zviera nemalo kŕmiť, ak expozícia nepresiahne šesť hodín. V priebehu celej expozície celého tela sa zvieraťu môže podať voda.

15. Pomocou vybratých cieľových koncentrácií by sa mal identifikovať cieľový orgán (orgány) a preukázať zrejmá reakcia na koncentráciu:

— vysoká úroveň koncentrácie by mala mať za následok toxické účinky, ale nemala by spôsobiť pretrvávajúce príznaky ani letalitu, ktoré by znemožnili zmysluplné hodnotenie,

— stredná úroveň (úrovne) koncentrácie by sa mala podávať v takých odstupoch, aby viedla k stupňovaniu toxických účinkov medzi dávkami nízkej a vysokej koncentrácie,

— nízka úroveň koncentrácie by mala vyvolať malé alebo žiadne príznaky toxicity.

Satelitná štúdia (štúdia reverzibility)

16. Satelitná štúdia (štúdia reverzibility) sa môže použiť na pozorovanie reverzibility, pretrvávania alebo oneskoreného výskytu toxicity počas primerane dlhého obdobia po skončení testovania, najmenej však počas 14 dní. Satelitné skupiny (reverzibility) pozostávajú z piatich samcov a piatich samíc, ktoré sú exponované súbežne s pokusnými zvieratami v základnej štúdii. Skupiny satelitnej štúdie (reverzibility) sú vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie pri najvyššej úrovni koncentrácie a súbežne sa podľa potreby vykonávajú vzduchové kontroly a/alebo kontroly nosiča (pozri odsek 17).

▼M4

Kontrolné zvieratá

17. S kontrolnými zvieratami súbežných negatívnych (vzduchových) kontrol sa zaobchádza rovnako ako so zvieratami testovacej skupiny s tou výnimkou, že sú vystavené filtrovanému vzduchu a nie testovanej chemikálii. Ak sa pri vytváraní testovacieho ovzdušia používa voda alebo iná látka, do štúdie je potrebné namiesto negatívnej (vzduchovej) kontrolnej skupiny zahrnúť kontrolnú skupinu nosiča. Vždy, keď je to možné, sa ako nosič použije voda. Ak sa ako nosič použije voda, kontrolné zvieratá by mali byť exponované vzduchu s rovnakou relatívnou vlhkosťou ako exponované skupiny exponované testovanej chemikálii. Výber vhodného nosiča by mal byť založený na primerane vykonanej predbežnej štúdii alebo na historických údajoch. Ak nie je toxicita nosiča dostatočne známa, vedúci štúdie sa môže rozhodnúť použiť negatívnu (vzduchovú) kontrolu aj kontrolu nosiča, ale tento postup sa vyslovene neodporúča. Ak z historických údajov vyplýva, že nosič nie je toxický, negatívna (vzduchová) kontrolná skupina nie je potrebná a mala by sa použiť iba kontrola nosiča. Ak sa pri predbežnej štúdii testovanej chemikálie pripravenej v nosiči nezistí žiadna toxicita, znamená to, že nosič pri testovanej koncentrácii nie je toxický a táto kontrola nosiča by sa mala použiť.

PODMIENKY EXPOZÍCIE

Podávanie koncentrácií

18. Zvieratá sú vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie vo forme plynu, pary, aerosólu alebo ich kombinácie. Fyzikálne skupenstvo, ktoré sa testuje, závisí od fyzikálno-chemických vlastností testovanej chemikálie, zvolenej koncentrácie a/alebo najpravdepodobnejšej fyzikálnej formy pri manipulácii a používaní testovanej chemikálie. Hygroskopické a chemicky reaktívne testované chemikálie by sa mali testovať v podmienkach suchého vzduchu. Treba dbať na to, aby sa nevytvorili výbušné koncentrácie. Tuhé materiály môžu byť podrobené mechanickým procesom na zmenšenie veľkosti častíc. Ďalšie usmernenia sa nachádzajú v dokumente GD 39 (2).

Rozdelenie veľkosti častíc

19. Častice my sa mali rozdeliť podľa veľkosti v prípade všetkých aerosólov a pár, ktoré môžu kondenzovať a vytvárať aerosóly. Na umožnenie expozície všetkých relevantných oblastí dýchacej sústavy sa odporúčajú aerosóly so stredným aerodynamickým hmotnostným priemerom (MMAD) v rozsahu od 1 do 3 μm so štandardnou odchýlkou geometrického priemeru (σ_g) v rozsahu od 1,5 do 3,0 (4). Hoci by sa malo vynaložiť primerané úsilie na dodržanie tejto normy, pokiaľ túto podmienku nie je možné splniť, treba predložiť odborný posudok. Napríklad v prípade kovových dymov môžu byť častice menšie, ako stanovuje táto norma, a nabité častice a vlákna môžu túto normu prekračovať.

Príprava testovanej chemikálie v nosiči

20. V ideálnom prípade sa testovaná chemikália testuje bez nosiča. Ak je nevyhnutné použiť nosič, aby sa dosiahla vhodná koncentrácia a veľkosť častíc testovanej chemikálie, uprednostňuje sa voda. Vždy, keď je testovaná chemikália rozpustená v nosiči, je potrebné preukázať jej stabilitu.

MONITOROVANIE PODMIENOK EXPOZÍCIE

Prúdenie vzduchu v komore

21. Prúdenie vzduchu cez expozičnú komoru by sa počas každej expozície malo dôkladne kontrolovať, nepretržite monitorovať a zaznamenávať aspoň raz za hodinu. Monitorovanie koncentrácie testovacieho ovzdušia v reálnom čase (alebo dočasnej stability) je integrálne meranie všetkých dynamických parametrov a poskytuje nepriamy prostriedok kontroly všetkých relevantných dynamických inhalačných parametrov. Ak sa koncentrácia monitoruje

▼M4

v reálnom čase, frekvencia meraní prúdenia vzduchu sa môže obmedziť na jedno meranie na expozíciu za deň. Je potrebné venovať osobitnú pozornosť tomu, aby v komorách na expozíciu oblasti nosa nedochádzalo k opätovnému vdychovaniu. Koncentrácia kyslíka by mala byť minimálne 19 % a koncentrácia oxidu uhličitého by nemala presiahnuť 1 %. Ak existuje dôvod domnievať sa, že túto normu nie je možné splniť, koncentrácie kyslíka a oxidu uhličitého by sa mali zmerať. Ak merania v prvý deň expozície preukážu, že úrovne týchto plynov sú správne, ďalšie merania nie sú nutné.

Teplota komory a relatívna vlhkosť

22. Teplotu v komore je potrebné udržiavať na úrovni 22 ± 3 °C. Relatívnu vlhkosť v dýchacej zóne zvierat pri expozícii oblasti nosa aj pri expozícii celého tela je potrebné počas každej expozície nepretržite monitorovať a podľa možnosti raz za hodinu zaznamenávať. Relatívna vlhkosť by sa podľa možnosti mala udržiavať v rozsahu od 30 do 70 %, ale môže sa stať, že táto hodnota bude nedosiahnuteľná (napr. v prípade testovania zmesí na báze vody) alebo nemerateľná z dôvodu interferencie testovanej chemikálie a testovacej metódy.

Testovaná chemikália: nominálna koncentrácia

23. Vždy, keď je to možné, by sa mala vypočítať a zaznamenať nominálna koncentrácia expozície v komore. Nominálna koncentrácia je hmotnosť vytvorenej testovanej chemikálie vydelená celkovým objemom vzduchu, ktorý prešiel systémom inhalačnej komory. Nominálna koncentrácia sa nepoužíva na charakterizáciu expozície zvierat, ale porovnanie nominálnej a skutočnej koncentrácie vypovedá o účinnosti vytvárania testovacieho systému, a teda sa môže použiť na zistenie problémov s tvorbou.

Testovaná chemikália: skutočná koncentrácia

24. Skutočná koncentrácia je koncentrácia testovanej chemikálie odobratej z dýchacej zóny zvierat v inhalačnej komore. Skutočné koncentrácie možno získať špecifickými metódami (napr. priamym odberom vzorky, adsorpčnými alebo chemicky reaktívnymi metódami a následnou analytickou charakterizáciou) alebo nešpecifickými metódami, ako je gravimetrická filtrová analýza. Použitie gravimetrickej analýzy je prípustné iba v prípade jednozložkových práškových aerosólov alebo aerosólov kvapalín s nízkou prchavosťou, pričom je potrebné túto analýzu podložiť primeranými testovými charakterizáciami predbežných štúdií týkajúcich sa konkrétnej chemikálie. Koncentráciu viaczložkových práškových aerosólov takisto možno stanoviť prostredníctvom gravimetrickej analýzy. V tom prípade sú však potrebné analytické údaje, ktoré dokazujú, že zloženie materiálu vo vzduchu je podobné ako zloženie východiskového materiálu. Ak tieto informácie nie sú dostupné, môže byť potrebná opätovná analýza testovanej chemikálie (ideálne v jej skupenstve v ovzduší) v pravidelných intervaloch v priebehu štúdie. V prípade aerosólových látok, ktoré sa môžu vyparіť alebo môžu sublimovať, by sa malo preukázať, že všetky fázy sa zhromaždili pomocou zvolenej metódy.

25. Ak je to možné, počas celej štúdie by sa mala použiť jedna dávka testovanej chemikálie, pričom testovaná vzorka by sa mala uskladniť za podmienok, za ktorých sa zachová jej čistota, homogenita a stabilita. Pred začatím štúdie by mala byť k dispozícii charakterizácia testovanej chemikálie vrátane jej čistoty a, ak je to technicky možné, identity a množstiev identifikovaných kontaminantov a prímesí. Charakterizáciu možno preukázať napríklad týmito údajmi: retenčný čas a relatívna plocha píku, molekulová hmotnosť získaná pomocou analýzy hmotnostnej spektrometrie alebo plynovej chromatografie alebo iné odhady. Hoci za identitu testovanej vzorky testovacie laboratórium nenesie zodpovednosť, je vhodné, aby testovacie laboratórium aspoň čiastočne potvrdilo charakterizáciu poskytnutú dodávateľom (napr. farbu, fyzikálne skupenstvo atď.).

▼M4

26. Podľa možnosti je potrebné udržiavať ovzdušie pri expozícii konštantné. Na preukázanie stability podmienok expozície sa môže použiť zariadenie na monitorovanie v reálnom čase, ako napríklad aerosólový fotometer pre aerosóly alebo komplexný uhľovodíkový analyzátor pre pary. Skutočná koncentrácia v komore by sa mala merať aspoň tri razy v každý deň expozície a pri každej úrovni expozície. Ak to pre nízky prietok vzduchu alebo nízke koncentrácie nie je možné, je prijateľný jeden odber vzorky počas intervalu expozície. V takom prípade by sa mala táto vzorka podľa možnosti odoberať za celé trvanie expozície. Jednotlivé vzorky koncentrácie v komore by sa nemali od strednej koncentrácie v komore odchýliť o viac ako ± 10 % v prípade plynov a pár a o viac ako ± 20 % v prípade kvapalných alebo tuhých aerosólov. Čas na dosiahnutie rovnováhy v komore (t_{95}) by sa mal vypočítať a mala by o ňom podať správa. Interval expozície zahŕňa čas, keď sa testovaná chemikália tvorí. Zohľadňuje sa pri tom čas potrebný na dosiahnutie rovnováhy v komore (t_{95}) a čas rozpadu. Usmernenia k odhadovaniu t_{95} sú uvedené v dokumente GD 39 (2).

27. V prípade veľmi komplexných zmesí tvorených plynmi/parami a aerosólov (napr. spaľovacieho ovzdušia a testovaných chemikálií poháňaných účelovými výrobkami/zariadeniami koncového použitia) sa v inhalačnej komore môže každá fáza správať inak. Preto by sa pre každú fázu (plyn/para a aerosól) mala vybrať aspoň jedna látka slúžiaca ako ukazovateľ (analyt), obyčajne hlavná aktívna látka v zmesi. Ak je testovaná chemikália zmes, v správe by sa mala uviesť analytická koncentrácia celej zmesi, nielen aktívnej látky alebo látky slúžiacej ako ukazovateľ (analyt). Ďalšie informácie týkajúce sa skutočných koncentrácií sú uvedené v dokumente GD 39 (2).

Testovaná chemikália: rozdelenie veľkosti častíc

28. Rozdelenie veľkosti častíc aerosólov by sa pri každej úrovni koncentrácie malo stanoviť aspoň raz za týždeň, a to pomocou kaskádového impaktora alebo alternatívneho prístroja, ako je napríklad aerodynamický spektrometer častíc (APS). Ak možno preukázať rovnocennosť výsledkov získaných pomocou kaskádového impaktora a alternatívneho prístroja, potom sa alternatívny prístroj môže používať počas celej štúdie.

29. Druhé zariadenie, ako je gravimetrický filter alebo impinger/premývačka, by sa malo použiť súbežne s hlavným prístrojom na potvrdenie zachytávacej účinnosti hlavného prístroja. Hmotnostná koncentrácia získaná analýzou veľkosti častíc by mala byť v rozsahu primeraných limitov hmotnostnej koncentrácie získanej filtrovou analýzou [pozri dokument GD 39 (2)]. Ak možno preukázať rovnocennosť pri všetkých koncentráciách testovaných v počiatočnej fáze štúdie, nie je potrebné vykonávať ďalšie potvrdzujúce merania. V záujme zabezpečenia dobrých životných podmienok pre zvieratá by sa mali prijať opatrenia na minimalizáciu nejednoznačných údajov, ktoré môžu viesť k potrebe opakovať štúdiu.

30. Rozdelenie veľkosti častíc by sa malo vykonať v prípade pár, ak existuje možnosť, že kondenzácia pary môže mať za následok tvorbu aerosólu, alebo ak sa v ovzduší pár zistia častice s potenciálom zmiešaných fáz.

POZOROVANIA

31. Zvieratá by sa mali pred, počas a po skončení expozície klinicky pozorovať. V závislosti od reakcie zvierat počas expozície môžu byť potrebné častejšie pozorovania. Ak pozorovaniu zvierat bráni používanie skúmaviek obmedzujúcich pohyb zvierat, slabo osvetlených komôr na expozíciu celého tela alebo nepriehľadné ovzdušie, zvieratá by sa mali dôkladne preskúmať po skončení expozície. Na základe pozorovaní pred expozíciou v nasledujúcom dni možno zhodnotiť akúkoľvek reverzibilitu alebo zhoršenie toxických účinkov.

▼M4

32. Všetky pozorovania sa zaznamenávajú, pričom každé zviera má individuálny záznam. Keď sa zvieratá usmrtia z humánnych dôvodov alebo sa nájdu uhynuté, je potrebné čo možno najpresnejšie zaznamenať čas uhynutia.

33. Pozorovania v klietkach sa zameriavajú na zmeny kože a srsti, očí, slizníc, dýchania a krvného obehu, zmeny nervového systému, somatomotoriky a správania. Pozornosť sa zameriava na pozorovanie triašky, kŕčov, slinenia, hnačky, letargie, spánku a kómy. Meraním rektálnej teploty možno získať dôkazy svedčiace o reflexnej bradypney alebo hypo/hypertermii, ktoré súvisia s testovaním alebo s obmedzením pohybu. Protokol o štúdii môže zahŕňať ďalšie hodnotenia, ako je napríklad kinetika, biomonitorovanie, funkcia pľúc, zadržiavanie slabo rozpustných materiálov, ktoré sa hromadia v pľúcnom tkanive, a zmeny správania.

TELESNÉ HMOTNOSTI

34. Hmotnosť jednotlivých zvierat je potrebné zaznamenať krátko pred prvou expozíciou (deň 0), potom dvakrát týždenne (napríklad: piatky a pondelky, aby sa preukázalo zotavenie po víkende bez expozícií, alebo v časovom intervale, ktorý umožňuje hodnotenie systémovej toxicity) a v čase uhynutia alebo utratenia. Ak sa v prvých dvoch týždňoch neobjavia žiadne účinky, po zvyšok štúdie sa môže telesná hmotnosť merať raz za týždeň. Satelitné zvieratá (na štúdiu reverzibility, ak sa použijú) sa naďalej vážia raz za týždeň počas celého obdobia zotavovania. Na konci štúdie by sa všetky zvieratá mali krátko pred utratením odvážiť, aby sa získali neskreslené vypočítané pomery hmotnosti orgánov k telu.

SPOTREBA POTRAVY A VODY

35. Spotreba potravy by sa mala merať raz za týždeň. Môže sa merať aj spotreba vody.

KLINICKÁ PATOLÓGIA

36. Hodnotenia klinickej patológie sa po utratení vykonávajú pri všetkých zvieratách vrátane kontrolných a satelitných zvierat. Je potrebné zaznamenať časový interval medzi skončením expozície a odberom krvi, najmä ak je rekonštitúcia sledovaného parametra rýchla. Odber vzoriek po skončení expozície je indikovaný pri tých parametroch, ktoré majú krátky biologický polčas v plazme (napr. COHb, CHE a MetHb).

37. V tabuľke 1 sa uvádza zoznam parametrov klinickej patológie, ktoré sa vo všeobecnosti požadujú pri všetkých toxikologických štúdiách. Rozbor moču sa bežne nevyžaduje, ale môže sa vykonať, ak sa na základe očakávanej alebo pozorovanej toxicity predpokladá, že bude užitočný. Vedúci štúdie sa môže rozhodnúť hodnotiť ďalšie parametre s cieľom lepšie charakterizovať toxicitu testovanej chemikálie (napr. cholínesteráza, lipidy, hormóny, acidobázická rovnováha, methemoglobín alebo Heinzove telieska, kreatinkináza, pomer myelocytov a erytrocytov, troponíny, plyny v arteriálnej krvi, laktátdehydrogenáza, sorbitol-dehydrogenáza, glutamát-dehydrogenáza a gama-glutamyl transpeptidáza).

▼M4

Tabuľka 1

Štandardné parametre klinickej patológie

Hematológia	
Počet erytrocytov	Celkový počet leukocytov
Hematokrit	Diferenciálny počet leukocytov
Koncentrácia hemoglobínu	Počet trombocytov
Stredný korpuskulárny hemoglobín	Potenciál zrážania krvi (vyberte jednu z možností):
Stredný korpuskulárny objem	— Protrombínový čas
Koncentrácia stredného korpuskulárneho hemoglobínu	— Čas zrážania krvi
Retikulocyty	— Čiastočný tromboplastínový čas
Klinická chémia	
Glukóza (*)	Alanín-amintransferáza
Celkový cholesterol	Aspartát-aminotransferáza
Triglyceridy	Alkalická fosfatáza
Dusík z močoviny v krvi	Draslík
Celkový bilirubín	Sodík
Kreatinín	Vápnik
Celkový obsah bielkovín	Fosfor
Albumíny	Chloridy
Globulíny	
Rozbor moču (nepovinné)	
Vzhľad (farba a zakalenie)	Celkový obsah bielkovín
Objem	Glukóza
Špecifická hmotnosť alebo osmolalita	Krv/krvinky
pH	

(*) Keďže dlhé obdobie bez kŕmenia môže pri pokusných zvieratách v porovnaní s kontrolnými zvieratami viesť k skresleniu meraní glukózy, vedúci štúdie by mal určiť, či je primerané, aby sa zvieratá nekŕmili. Ak sa použije obdobie bez kŕmenia, malo by byť primerané použitému živočíšnemu druhu; pri potkanoch to môže byť 16 hodín (nočný pôst). Stanovenie glukózy nalačno sa môže vykonať po nočnom pôste počas posledného týždňa expozície alebo po nočnom pôste pred pitvou (v druhom prípade spolu so všetkými ostatnými parametrami klinickej patológie).

38. Ak existuje dôkaz, že hlavným miestom usadzovania a zachytávania sú dolné dýchacie cesty (t. j. alveoly), ako metóda kvantitatívnej analýzy hypotetických parametrov účinnosti dávky zameranej na hypersenzitívnu pneumonitídu, zápal pľúc a fosfolipidózu sa môže zvoliť bronchoalveolárna laváž (BAL). Tá umožňuje primerane preskúmať priebežné zmeny alveolárneho poškodenia súvisiace so závislosťou reakcie od dávky. Z tekutiny bronchoalveolárnej laváže sa môže analyzovať celkový a diferenciálny počet leukocytov, celkový obsah bielkovín a laktát-dehydrogenáza. Ďalej sa môžu zvážiť parametre indikujúce lyzozomálne poškodenie, fosfolipidózu, fibrózu a dráždivé alebo alergické zápaly, ktoré môžu zahŕňať stanovenie zápalových cytokínov/chemokínov. Merania BAL vo všeobecnosti dopĺňajú výsledky histopatologických testov, nemôžu ich však nahradiť. Usmernenia o postupe pľúcnej laváže sú uvedené v dokumente GD 39 (2).

▼M4

MAKROSKOPICKÁ PATOLÓGIA A ORGÁNOVÉ HMOTNOSTI

39. Všetky testované zvieratá vrátane tých, ktoré uhynú počas testu alebo sa vylúčia zo štúdie z dôvodu starostlivosti o zvieratá, sa podrobujú úplnému vykrveniu (ak je uskutočniteľné) a makroskopickej autopsii. Pri každom zvierati sa zaznamená čas medzi skončením poslednej expozície a utratením. Ak nie je možné vykonať autopsiu ihneď po objavení uhynutého zvieraťa, zviera sa schladí (nie zmrazí) na dostatočne nízku teplotu, aby sa minimalizovala autolýza. Autopsie by sa mali vykonať čo najskôr, zvyčajne v priebehu jedného alebo dvoch dní. Pri každom zvierati sa zaznamenajú všetky makroskopické patologické zmeny, pričom osobitná pozornosť sa venuje akýmkoľvek zmenách v dýchacej sústave.

40. V tabuľke 2 sa uvádza zoznam orgánov a tkanív, ktoré je počas makroskopickej pitvy potrebné zachovať vo vhodnom médiu na účely histopatologického vyšetrenia. O uchovaní orgánov a tkanív [v zátvorke] a všetkých ostatných orgánov a tkanív rozhodne vedúci štúdie. Orgány vyznačené **tučným** písmom by sa mali čo najskôr po disekcii upraviť a odvážiť v mokrom stave, aby sa zabránilo ich vyschnutiu. Štítna žľaza a nadsemenníky by sa mali vážiť iba v prípade potreby, lebo úprava artefaktov môže brániť histopatologickému hodnoteniu. Tkanivá a všetky orgány sa fixujú v 10 % formalínovom tlmivom roztoku alebo v inom vhodnom fixačnom prostriedku ihneď po vykonaní autopsie a nie skôr ako 24 – 48 hodín pred úpravou v závislosti od použitého fixačného prostriedku.

Tabuľka 2

Orgány a tkanivá zachované počas makroskopickej pitvy

Nadobličky	Semenné mechúriky
Kostná dreň (a/alebo čerstvý aspirát)	Miecha (krčná, hrudná a lumbálna)
Mozog (vrátane častí predného mozgu, mozočka a predĺženej miechy/mosta)	**Slezina**
	Žalúdok
[Oči (sietnica, očný nerv) a očné viečka]	**Semenníky**
Srdce	**Týmus**
Obličky	Štítna žľaza
Hrtan (tri úrovne, jedna úroveň má zahŕňať základňu epiglotis)	Priedušnica (aspoň dve úrovne vrátane jedného pozdĺžneho rezu cez karinu a jedného priečneho rezu)
Pečeň	[Močový mechúr]
Pľúca (všetky laloky na jednej úrovni vrátane hlavných priedušiek)	Maternica
	Všetky makroskopické poškodenia
Lymfatické uzliny z hilovej oblasti pľúc najmä v prípade tuhých testovaných chemikálií so slabou rozpustnosťou. Pri detailnejších testoch a/alebo štúdiách s imunologickým zameraním sa môžu zvážiť ďalšie lymfatické uzliny, napr. z mediastinálnych, cervikálnych/submandibulárnych a/alebo aurikulárnych oblastí.	
Nosohltanové tkanivá [aspoň štyri úrovne; jedna úroveň zahŕňa nosohltanovú trubicu a nosové lymfoidné tkanivo (NALT)]	
Pažerák	
[Čuchový bulbus]	
Vaječníky	

▼M4

41. Pľúca by sa mali odňať neporušené, odvážiť a napustiť vhodným fixačným prostriedkom pri tlaku 20 – 30 cm vody, aby sa zachovala ich štruktúra (5). Je potrebné odobrať rezy všetkých lalokov na jednej úrovni vrátane hlavných priedušiek, ale ak sa robí pľúcna laváž, mali by sa vykonať rezy nelavážovaného laloku na troch úrovniach (nie sériové rezy).

42. Preskúmajú sa najmenej štyri úrovne nosohltanových tkanív, z ktorých jedna by mala obsahovať nosohltanovú trubicu (5, 6, 7, 8, 9), aby sa umožnilo vhodné preskúmanie dlaždicového, prechodného (neriasinkového dýchacieho), dýchacieho (riasinkového dýchacieho) a čuchového epitelu a odvodného lymfatického tkaniva (NALT; 10, 11). Preskúmajú sa tri úrovne hrtana, pričom jedna z týchto úrovní by mala obsahovať základňu epiglotis (12). Je potrebné preskúmať aspoň dve úrovne priedušnice vrátane jedného pozdĺžneho rezu cez karinu bifurkácie extrapulmonárnych priedušiek a jedného priečneho rezu.

HISTOPATOLÓGIA

43. Pri kontrolných skupinách a skupinách s vysokými koncentráciami a pri všetkých zvieratách, ktoré uhynú alebo sú utratené počas štúdie, sa vykoná histopatológia všetkých orgánov a tkanív vymenovaných v tabuľke 2. Osobitná pozornosť by sa mala venovať dýchacím cestám, cieľovým orgánom a makroskopickým poškodeniam. Orgány a tkanivá, ktoré majú poškodenia v skupine s vysokými koncentráciami, sa preskúmajú pri všetkých skupinách. Vedúci štúdie sa môže rozhodnúť pre vykonanie histopatologických hodnotení pri ďalších skupinách s cieľom preukázať jednoznačnú reakciu na koncentráciu. Ak boli použité satelitné skupiny (reverzibilita), histopatologické hodnotenie sa vykoná v prípade všetkých tkanív a orgánov, pri ktorých boli v testovaných skupinách zistené účinky. Ak v skupine s vysokou expozíciou došlo k nadmernému predčasnému úhynu alebo iným problémom, ktoré spochybňujú významnosť údajov, je potrebné histopatologicky preskúmať najbližšiu nižšiu koncentráciu. Sledovanie nálezov pitvy by malo korelovať s mikroskopickými nálezmi.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

44. Je potrebné uviesť údaje o telesnej hmotnosti, spotrebe potravy, klinickej patológii, makroskopickej patológii, orgánových hmotnostiach a histopatológii jednotlivých zvierat. Údaje z klinických pozorovaní sa zhrnú v podobe tabuliek, kde sa uvedie pre každú pokusnú skupinu počet použitých zvierat, počet zvierat vykazujúcich špecifické príznaky toxicity, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu alebo ich usmrtili z humánnych dôvodov, čas uhynutia jednotlivých zvierat, opis a časový priebeh toxických účinkov a reverzibility a pitevné nálezy. Všetky výsledky, kvantitatívne aj náhodné, sa vyhodnotia primeranou štatistickou metódou. Možno použiť akúkoľvek všeobecne akceptovanú štatistickú metódu, pričom štatistické metódy je potrebné vybrať počas plánovania štúdie.

Správa o teste

45. Správa o teste by mala podľa potreby obsahovať tieto informácie:

Testované zvieratá a chov:

— opis podmienok v klietke vrátane: počtu (alebo zmeny počtu) zvierat na klietku, výstelky, teploty prostredia a relatívnej vlhkosti, dĺžky svetlej fázy a identifikácie krmiva,

▼M4

— použité druhy/kmene a odôvodnenie použitia druhov iných ako potkany, môže sa uviesť zdroj a historické údaje, ak sa týkajú zvierat v podobných podmienkach expozície, umiestnenia a nekŕmenia,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— metóda randomizácie,

— opis akýchkoľvek podmienok pred testovaním vrátane krmiva, karantény a liečby chorôb.

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter, čistota a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti (vrátane izomerizácie),

— identifikačné údaje a registračné číslo CAS (Chemical Abstract Services), ak je známe.

Nosič:

— odôvodnenie použitia nosiča a odôvodnenie výberu nosiča (ak je iný ako voda),

— historické alebo paralelne získané údaje preukazujúce, že nosič nemá vplyv na výsledky štúdie.

Inhalačná komora:

— podrobný opis inhalačnej komory vrátane objemu a nákresu,

— zdroj a opis zariadenia použitého na expozíciu zvierat, ako aj na vytvorenie ovzdušia,

— zariadenie na meranie teploty, vlhkosti, veľkosti častíc a skutočnej koncentrácie,

— zdroj vzduchu a použitý klimatizačný systém,

— metódy použité na kalibráciu zariadenia s cieľom zabezpečiť homogénne testovacie ovzdušie,

— rozdiel tlakov (pozitívny alebo negatívny),

— expozičné otvory na jednu komoru (v prípade expozície oblasti nosa), umiestnenie zvierat v komore (v prípade expozície celého tela),

— stabilita testovacieho ovzdušia,

— umiestnenie senzorov teploty a vlhkosti a odber vzorky testovacieho ovzdušia v komore,

— manipulácia s privádzaným/extrahovaným vzduchom,

— hodnoty prietoku vzduchu, prietok vzduchu na jeden expozičný otvor (v prípade expozície oblasti nosa) alebo množstvo zvierat na komoru (v prípade expozície celého tela),

— čas potrebný na dosiahnutie rovnováhy v inhalačnej komore (t95),

— počet zmien objemu za hodinu,

— meracie prístroje (ak sa použili),

Údaje o expozícii:

— odôvodnenie výberu cieľovej koncentrácie pre základnú štúdiu,

▼M4

— nominálne koncentrácie (celková hmotnosť testovanej chemikálie aplikovanej do inhalačnej komory vydelená objemom vzduchu, ktorý prešiel komorou),

— skutočné koncentrácie testovanej chemikálie zachytenej z dýchacej zóny zvierat, v prípade zmesí, ktoré vytvárajú heterogénne fyzikálne skupenstvá (plyny, pary, aerosóly) možno každé skupenstvo analyzovať samostatne,

— všetky koncentrácie vzduchu sa udávajú v hmotnostných jednotkách (mg/l mg/m^3 atď.), nie v objemových jednotkách (ppm, ppb atď.),

— rozdelenie veľkosti častíc, stredný aerodynamický hmotnostný priemer (MMAD) a štandardná odchýlka geometrického priemeru (σ_g) vrátane metód ich výpočtu. Jednotlivé analýzy veľkosti častíc sa uvedú v správe.

Podmienky testovania:

— podrobné informácie o príprave testovanej chemikálie vrátane podrobných údajov o všetkých postupoch použitých na zmenšenie veľkosti častíc tuhých látok alebo na prípravu roztokov testovanej chemikálie,

— opis (podľa možnosti spolu s nákresom) zariadenia použitého na vytvorenie testovacieho ovzdušia a na expozíciu zvierat testovaciemu ovzdušiu,

— podrobné informácie o zariadeniach použitých na monitorovanie teploty, vlhkosti a prúdenia vzduchu v komore (napr. vývoj kalibračnej krivky),

— podrobné informácie o zariadeniach použitých pri odbere vzoriek na stanovenie koncentrácie v komore a rozdelenia veľkosti častíc,

— podrobné informácie o použitej chemickej analytickej metóde a o overení metódy (vrátane účinnosti výťažnosti testovanej chemikálie z prostriedku na odber vzorky),

— metóda randomizácie pri prideľovaní zvierat do testovacích a kontrolných skupín,

— údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu/zdroja krmiva, zdroja vody),

— odôvodnenie výberu testovacích koncentrácií.

Výsledky:

— tabuľkové spracovanie teploty, vlhkosti a prúdenia vzduchu v komore,

— tabuľkové spracovanie údajov o nominálnych a skutočných koncentráciách,

— tabuľkové spracovanie údajov o veľkosti častíc vrátane údajov o odbere vzoriek na analýzu, o rozdelení veľkosti častíc a o výpočtoch MMAD a σ_g,

— tabuľkové spracovanie získaných údajov o reakcii a úrovni koncentrácie pre každé zviera (t. j. zvieratá vykazujúce príznaky toxicity vrátane mortality, charakteru, závažnosti, času nástupu a trvania účinkov),

▼M4

— tabuľkové spracovanie hmotností jednotlivých zvierat,

— tabuľkové spracovanie spotreby potravy,

— tabuľkové spracovanie údajov klinickej patológie,

— pitevné nálezy a histopatologické nálezy pre každé zviera, ak sú k dispozícii,

— tabuľkové spracovanie akýchkoľvek ďalších meraných parametrov.

Rozbor a interpretácia výsledkov:

— osobitný dôraz sa kladie na opis metód použitých na splnenie kritérií tejto testovacej metódy, napr. limitnej koncentrácie alebo veľkosti častíc,

— dýchateľnosť častíc vzhľadom na celkové zistenia sa uvedie, najmä ak nebolo možné splniť kritériá na veľkosť častíc,

— konzistencia metód použitých na stanovenie nominálnej a skutočnej koncentrácie a vzťah skutočnej koncentrácie k nominálnej koncentrácii sa uvedú v celkovom hodnotení štúdie,

— uvedie sa pravdepodobná príčina uhynutia a prevládajúci druh pôsobenia (systémové verzus lokálne),

— uvedie sa odôvodnenie, ak bolo potrebné humánnym spôsobom utratiť zvieratá, ktoré mali bolesti alebo vykazovali príznaky silného alebo pretrvávajúceho utrpenia, v súlade s kritériami v usmerňovacom dokumente OECD o humánnych parametroch (Guidance Document on Humane Endpoints) (3),

— identifikuje sa cieľový orgán (orgány),

— stanoví sa NOAEL a LOAEL.

LITERATÚRA

1. OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paríž.

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, Paríž.

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, Paríž.

4. Whalan, J. E., a Redden, J. C. (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, D. L., Tyler, W. S., Plopper, C. E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H. P. a Brain, J. D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, s. 229 – 258.

6. Young, J. T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309 – 312.

7. Harkema, J. R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231 – 238.

▼**M4**

8. Woutersen, R. A., Garderen-Hoetmer, A., van Slootweg, P. J., Feron, V. J. (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP a Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, s. 215 – 263.

9. Mery, S., Gross, E. A., Joyner, D. R., Godo, M., Morgan, K. T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353 – 372.

10. Kuper, C. F., Koornstra, P. J., Hameleers, D. M. H., Biewenga, J., Spit, B. J., Duijvestijn, A. M., Breda Vriesman van, P. J. C., Sminia, T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219 – 224.

11. Kuper, C. F., Arts, J. H. E., Feron, V. J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140 – 141: s. 281 – 285.

12. Lewis, D. J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419 – 428.

13. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006 (Ú. v. EÚ L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼**M4**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMU

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼B

B.9. **TOXICITA PO 28–DŇOVEJ OPAKOVANEJ DÁVKE (DERMÁLNA)**

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod časť B (A).

1.2. POJMY

Pozri všeobecný úvod časť B (B).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Testovaná látka sa nanáša na kožu denne v odstupňovaných dávkach viacerým skupinám pokusných zvierat, a to jedna dávka na jednu skupinu počas 28 dní. Počas trvania testu sa zvieratá denne pozorujú, aby sa zistili symptómy toxických účinkov. Zvieratá, ktoré uhynú počas testu, ako aj zvieratá, ktoré prežijú do konca testu, sa pitvú.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNE J METÓDY

1.6.1. **Príprava**

Zvieratá si pred začatím testu zvykajú minimálne 5 dní na experimentálne chovateľské a kŕmne podmienky. Pred testom sa zdravé mladé zvieratá randomizujú a priraďujú k jednotlivým exponovaným a kontrolným skupinám. Krátko pred začatím testu sa strihá srsť na chrbte pokusných zvierat. Oholenie srsti je tiež možné, ale dalo by sa vykonať 24 hodín pred začatím testu. Opakované strihanie a holenie je zvyčajne potrebné približne v týždňových intervaloch. Je potrebné dbať na to, aby sa nepoškodila koža. Na aplikáciu sa musí pripraviť minimálne 10 % povrchu kože. Pri určovaní oblasti určenej na ostrihanie aplikačnej plochy sa zohľadňuje hmotnosť zvierat. Ak sa používajú tuhé látky, ktoré sa môžu jemne rozomlieť na prášok, mala by byť testovaná látka dostatočne navlhčená vodou alebo tam, kde je to potrebné, vhodným vehikulom, aby sa zabezpečil dobrý kontakt s kožou. Tekuté testované látky sa vo všeobecnosti používajú nezriedené. Aplikácia sa vykonáva denne 5 až 7 dní za týždeň.

1.6.2. **Podmienky skúšania**

1.6.2.1. *Pokusné zvieratá*

Môže sa použiť dospelý potkan, králik alebo morča. Môžu sa použiť aj iné druhy, ich použitie sa však musí zdôvodniť.

▼B

Odchýlka telesnej hmotnosti zvierat daného testu by nemala byť na začiatku testu viac ako ± 20 % od príslušnej strednej priemernej hodnoty.

1.6.2.2. *Počet a pohlavie*

Pre každú veľkosť dávky sa používa minimálne 10 zvierat (5 samčekov a 5 samičiek) so zdravou, nepoškodenou kožou. Samičky musia byť nezapustené a nesmú byť gravidné. Ak sa majú počas testu humánne usmrtiť zvieratá, tak sa musí celkový počet zvierat zvýšiť o počet zvierat, ktoré majú byť humánne usmrtené, ešte pred koncom testu. Okrem toho sa môže exponovať satelitná skupina s 10 zvieratami (5 zvierat na pohlavie) počas 28 dní s najvyššou dávkou a počas nasledujúcich 14 dní bez ošetrenia sa dbá na reverzibilitu, pretrvávanie alebo oneskorený prejav toxických účinkov. Používa sa tiež satelitná skupina s 10 kontrolnými zvieratami (5 zvierat na pohlavie).

1.6.2.3. *Veľkosti dávok*

Musia sa zvoliť minimálne tri dávky, ako aj jedna kontrolná skupina, alebo ak sa použije pomocná látka, kontrolná skupina s pomocnou látkou. Čas pôsobenia by mal trvať minimálne 6 hodín denne. Aplikácia testovanej látky by sa mala vykonávať v ten istý čas každý deň a prispôsobenie dávky telesnej hmotnosti sa vykonáva v stanovených intervaloch (raz týždenne alebo dvakrát týždenne), aby sa zachovala konštantná hladina dávky v relácii k telesnej hmotnosti. Odhliadnuc od aplikácie testovanej látky, zvieratá kontrolnej skupiny sa ošetrujú rovnakým spôsobom ako pokusné zvieratá. Ak sa na uľahčenie aplikácie použije vehikulum, tak sa kontrolnej skupine podáva vehikulum rovnakým spôsobom ako exponovaným zvieratám, a to v množstve, aké dostane skupina s najvyššou dávkou. Najvyššia dávka sa volí tak, aby sa v každom prípade prejavili toxické efekty, ale aby zvieratá neuhynuli alebo iba v malom množstve. Najnižšia dávka by nemala vyvolávať žiadne príznaky toxicity. Ak existujú použiteľné odhady o výške expozície u človeka, tak by mala najnižšia dávka túto hodnotu prekračovať. Podľa možnosti by mala stredná dávka spôsobovať len malé toxické účinky. Ak sa podávajú viaceré medzidávky, tak sa majú voliť tak, aby došlo k postupnej klasifikácii toxických účinkov. V skupinách s nízkou alebo strednou dávkou, ako aj v kontrolných skupinách by mal byť počet úmrtí nízky, aby sa zabezpečilo kvalitné vyhodnotenie výsledkov.

Ak aplikácia testovanej látky vedie k silným podráždeniam kože, mala by sa koncentrácia znížiť, čo môže pri vysokej dávke viesť k zníženiu alebo vynechaniu ostatných toxických účinkov. Ak sa okrem toho koža veľmi poškodila, je za určitých okolností potrebné prerušiť test a nanovo ho realizovať s nižšími koncentráciami.

1.6.2.4. *Limitný test*

Ak pri realizácii predčasnej štúdie podanie dávky 1 000 mg/kg alebo vyššej dávky, ktorá zodpovedá možnej expozícii u človeka, nespôsobí žiadne toxické účinky, nie je potrebný ďalší test.

1.6.2.5. *Čas pozorovania*

Pri všetkých zvieratách sa denne pozorujú symptómy toxických účinkov. Smrť a čas vzniku a zániku symptómov sa musia zaznamenať.

▼B

1.6.3. **Postup**

Zvieratá sa musia udržiavať jednotlivo v klietkach. Testovanú látku dostávajú sedem dní do týždňa počas 28 dní. Zvieratá satelitnej skupiny, ktoré sú určené na dodatočné pozorovanie, by mali byť ďalších 14 dní bez ošetrenia, aby sa pozorovala reverzibilita alebo pretrvávanie toxických účinkov. Expozičná doba je minimálne šesť hodín denne.

Testovaná látka sa nanáša jednotne na oblasť, ktorá zodpovedá asi 10 % povrchu tela. Pri veľmi toxických látkach sa môže ošetrovať plocha menšia, ale väčšia plocha by mala byť exponovaná čo možno s najtenšou a najrovnomernejšou vrstvou.

Testovaná látka sa počas expozičnej doby udržiava v kontakte s kožou pomocou gázového obväzu a jednej náplasti. Pokusná plocha sa musí okrem toho zakryť vhodným spôsobom, aby sa gázový obväz a testovaná látka prichytili a zaistili a aby zvieratá nemohli orálne prijať testovanú látku. Môžu sa použiť aj prostriedky na obmedzenie slobody pohybu, avšak úplná imobilizácia sa neodporúča. Ako alternatíva sa môže použiť „manžeta na krk“.

Po uplynutí expozičnej doby sa odstráni, pokiaľ je to možné, zvyšok testovanej látky, a to použitím vody alebo iným vhodným postupom na čistenie kože.

Všetky zvieratá sa musia denne sledovať a zapisovať príznaky toxických účinkov vrátane času vzniku, ako aj stupňa a trvania. Sledovania sa majú zameriavať hlavne na zmeny na koži, srsti, očiach a slizniciach, dýchaní, krvnom obehu, autonómnom a centrálnom nervovom systéme, ako aj na somatomotorike a na správaní. Príjem potravy a hmotnosť zvierat sa určujú každý týždeň. Pravidelné pozorovanie zvierat je potrebné, aby sa dalo čo najlepšie zabezpečiť, aby zvieratá neuhynuli počas testu na kanibalizmus, autolýzu tkanív alebo chybu pri premiestňovaní. Po ukončení testu sa všetky zvieratá, ktoré prežili, s výnimkou satelitnej skupiny, pitvú. Hynúce zvieratá, ako aj zvieratá, u ktorých sa zistili silné príznaky utrpenia alebo bolesti, sa musia okamžite oddeliť, humánne usmrtiť a pitvať metódou prijateľnou pre zvieratá.

Na konci testu sa musia všetky zvieratá, vrátane kontrolných zvierat, podrobiť nasledujúcim vyšetreniam:

1. hematologickému vyšetreniu, ktoré by malo zahŕňať aspoň určovanie hodnoty hematokrytu a koncentrácie hemoglobínu, počet erytrocytov, celkový a diferenciálny počet leukocytov, ako aj hemokoagulačné parametre;

2. klinickobiochemickej analýze krvi: na posúdenie funkcie pečene a obličiek by sa mal určiť minimálne jeden z týchto parametrov: alanín-amino-tranferáza (skôr známa ako sérum-glutamát-pyruvat-transamináza), asparta-aminotranferáza (skôr známa ako sérum-glutamát-oxalacetát-transamináza), močovinový dusík, albumín, kreatinín, celkový bilirubín a celkové bielkoviny v sére.

Ďalšie stanovenia, ktoré môžu byť potrebné na adekvátne toxikologické vyhodnotenie, zahŕňajú: vápnik, fosfor, chlorid, sodík, draslík, glukózu nalačno, lipidy, hormóny, rovnováhu medzi kyselinami a zásadami, methemoglobín a aktiviu cholínesterázy.

▼B

Tam, kde je to potrebné, sa môžu využiť dodatočné klinickobiochemické analýzy na rozšírenie skúmania pozorovaných účinkov.

1.6.4. **Pitva**

Na všetkých zvieratách, ktoré sa zúčastnili na teste, sa vykoná kompletná autopsia. Aspoň pečeň, obličky, nadobličky a semenníky sa čo najskôr po sekcii odvážia vlhké, aby sa zabránilo ich vysychaniu. Orgány a tkanivá, t. j. neexponovaná a exponovaná koža, pečeň, obličky, slezina, semenníky, nadobličky, srdce a cieľové orgány (orgány s makroskopickými zmenami alebo zmenami veľkosti), sa uchovávajú vo vhodnom médiu na možné neskoršie histopatologické vyšetrenie.

1.6.5. **Histopatologické vyšetrenia**

U všetkých zvierat skupiny s najvyššou dávkou, ako aj u zvierat kontrolnej skupiny sa musí vykonať histologické vyšetrenia konzervovaných orgánov a tkanív. Všetky orgány a tkanivá, ktoré vykazujú v skupinách s najvyššou dávkou poškodenia podmienené testovanou látkou, sa musia vyšetriť aj v ostatných skupinách s nižšou dávkou. U zvierat satelitnej skupiny sa musia veľmi dôkladne vyšetriť tie orgány a tkanivá, v ktorých sa u ostatných exponovaných skupín prejavili príznaky otravy.

2. **ÚDAJE**

Údaje sa zhrnú do tabuľky, z ktorej musí byť jasný počet zvierat pre každú testovanú skupinu a kontrolnú skupinu na začiatku testu a počet zvierat s jednotlivými formami poškodenia.

Všetky zistené výsledky sa vyhodnocujú vhodnou štatistickou metódou. Môže sa použiť akákoľvek uznávaná štatistická metóda.

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

— údaje o zvieratách (druh, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo atď.),

— podmienky skúšania (vrátane druhu obväzu: okluzívny alebo neokluzívny),

— veľkosti dávky (vrátane vehikula, ak sa použilo) a koncentráciu,

— tam, kde je to možné, „no effect-level“,

— údaje o toxických reakciách podľa pohlavia a koncentrácie,

— čas smrti počas testu alebo údaj, či zvieratá test prežili do konca testu,

— toxické a iné účinky,

— čas pozorovania jednotlivých príznakov toxických účinkov, ich ďalší priebeh,

— údaje o kŕmení a telesnú hmotnosť,

— hematologické testy a ich výsledky,

▼B

— klinickobiochemické testy a ich výsledky,

— pitevné nálezy,

— podrobný opis histopatologických nálezov,

— štatistické vyhodnotenie výsledkov,

— diskusiu o výsledkoch,

— interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B (D).

4. **ODKAZY**

Pozri všeobecný úvod časť B (E).

▼M7

B.10. TEST *IN VITRO* NA CHROMOZÓMOVÉ ABERÁCIE U CICAVCOV

ÚVOD

Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov 473 (2016). Je súčasťou série testovacích metód v oblasti genetickej toxikológie. V tejto súvislosti bol vypracovaný aj dokument OECD, ktorý poskytuje stručné informácie o vykonávaní testov v oblasti genetickej toxikológie a prehľad o súčasných zmenách, ktorými tieto usmernenia na vykonávanie testov prešli (1).

Účelom testu na chromozómové aberácie *in vitro* je identifikovať chemikálie, ktoré spôsobujú štruktúrne chromozómové aberácie v bunkových kultúrach cicavcov (2) (3) (4). Štruktúrne chromozómové aberácie sa vyskytujú v dvoch typoch, chromozómové alebo chromatidové. V *in vitro* testoch na chromozómové aberácie môže vzniknúť polyploidia (vrátane endoreduplikácie). Zatiaľ čo aneugény môžu vyvolať vznik polyploidie, samotná polyploidia nenaznačuje aneugénny potenciál a môže jednoducho znamenať narušenie bunkového cyklu alebo cytotoxicitu (5). Tento test nie je určený na meranie aneuploidie. Na zistenie aneuploidie by sa mohol doporučiť *in vitro* mikronukleový test (6).

V *in vitro* teste na chromozómové aberácie možno používať kultúry zavedených (permanentných) bunkových línií alebo primárne bunkové kultúry ľudského alebo hlodavčieho pôvodu. Použité bunky by sa mali vyberať na základe schopnosti rastu v kultúre, stability karyotypu (vrátane počtu chromozómov), ako aj frekvencie spontánnych chromozómových aberácií (7). Na základe v súčasnosti dostupných údajov nemožno vysloviť jednoznačné odporúčania, vyplýva z nich však to, že pri hodnotení nebezpečnosti chemikálií je dôležité zvážiť stav *p53*, genetickú stabilitu (stabilitu karyotypu), kapacitu na opravu DNA a pôvod (hlodavčí alebo ľudský) buniek vybratých pre testovanie. Keďže poznatky v tejto oblasti sa vyvíjajú, používateľom tejto testovacej metódy sa odporúča, aby zvážili vplyv týchto a iných charakteristík buniek na výkonnosť bunkovej línie pri detekcii indukcie chromozómových aberácií.

Použité definície sú uvedené v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

Testy, ktoré sa vykonávajú *in vitro*, si zvyčajne vyžadujú použitie exogénneho zdroja metabolickej aktivácie okrem prípadov, keď majú bunky metabolickú kapacitu s ohľadom na testované chemikálie. Exogénny systém metabolickej aktivácie nenapodobňuje v plnej miere podmienky *in vivo*. Bolo by sa treba vyhnúť podmienkam, ktoré by mohli viesť k falošne pozitívnym výsledkom, t. j. poškodeniam chromozómov nespôsobeným priamou interakciou medzi testovanými chemikáliami a chromozómami. Takéto podmienky zahŕňajú zmeny pH alebo osmolality (8) (9) (10), interakciu so zložkami média (11) (12) alebo nadmerné úrovne cytotoxicity (13) (14) (15) (16).

Tento test sa používa na detekciu chromozómových aberácií, ktoré môžu byť výsledkom klastogénnych udalostí. Analýza indukcie chromozómových aberácií by sa mala vykonať na bunkách v metafáze. Je preto nevyhnutné, aby bunky dosiahli mitózu v ovplyvňovaných aj v neovplyvňovaných kultúrach. V prípade vyrobených nanomateriálov môže byť potrebné túto testovaciu metódu osobitne upraviť, tieto úpravy však nie sú opísané v tejto testovacej metóde.

Pred použitím testovacej metódy v prípade zmesi s cieľom generovať údaje pre stanovený regulačný účel by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť primerané výsledky na tento účel, a ak áno, malo by sa to zdôvodniť. Takéto úvahy nie sú potrebné, ak existuje regulačná požiadavka na testovanie zmesi.

▼M7

PRINCÍP TESTU

Bunkové kultúry ľudského pôvodu alebo pochádzajúce z iných cicavcov sú vystavené testovanej chemikálii spolu s exogénnym zdrojom metabolickej aktivácie aj bez neho, pokiaľ nie sú použité bunky so zodpovedajúcou schopnosťou metabolizácie (pozri bod 13). Vo vhodných vopred určených intervaloch po začatí expozície bunkových kultúr testovanej chemikálii sa tieto bunkové kultúry ošetria chemikáliou zastavujúcou bunkové delenie v metafáze (napr kolcemidom alebo kolchicínom), odoberú sa, zafarbia sa a bunky v metafáze sa mikroskopicky analyzujú na prítomnosť aberácií chromatidového a chromozómového typu.

OPIS METÓDY

Príprava

Bunky

Použiť možno rôzne bunkové línie [napr. bunky vaječníkov škrečka čínskeho (CHO), pľúcne bunky škrečka čínskeho V79, pľúcne bunky škrečka čínskeho (CHL)/IU, TK6] alebo primárne bunkové kultúry vrátane periférnych lymfocytov ľudí alebo iných cicavcov (7). Výber použitých bunkových línií by sa mal vedecky odôvodniť. Ak sa použijú primárne bunky, z dôvodu dobrých životných podmienok zvierat by sa malo podľa možnosti zvážiť použitie primárnych buniek ľudského pôvodu, pričom by sa mal odber vzoriek uskutočniť v súlade s etickými zásadami a právnymi predpismi. Ľudské periférne lymfocyty by sa mali získať od mladých (približne 18 až 35 ročných) nefajčiarov, ktorí podľa známych informácií netrpia nejakou chorobou, a ktorí v poslednom čase neboli vystavení genotoxickým činiteľom (napr. chemikáliám, ionizujúcemu žiareniu) na úrovniach, ktoré by zvýšili výskyt chromozómových aberácií v pozadí. Tým by sa zabezpečil nízky a ustálený výskyt chromozómových aberácií v pozadí. Základný výskyt chromozómových aberácií sa vekom zvyšuje, pričom je tento trend výraznejší u žien než u mužov (17) (18). Ak sa spoločne použijú bunky od viacerých darcov, mal by sa uviesť počet darcov. Je potrebné preukázať, že bunky sa v čase od začiatku aplikácie testovanej chemikálie do odberu vzoriek delili. Bunkové kultúry sú udržiavané v exponenciálnej fáze rastu buniek (bunkové línie) alebo sa ich delenie stimuluje (primárne kultúry lymfocytov), aby boli testovanej chemikálii vystavené bunky v rôznych fázach bunkového cyklu, pretože citlivosť jednotlivých fáz bunkového cyklu na testovanú chemikáliu nemusí byť známa. Primárne bunky, ktoré sa musia stimulovať mitogénnymi aktivátormi, aby sa delili, sa už vo všeobecnosti počas vystavenia testovanej chemikálii nesynchronizujú (napr. ľudské lymfocyty po 48 hodinách mitogénnej stimulácie). Používanie synchronizovaných buniek sa počas ovplyvňovania neodporúča, ale môže byť prijateľné, ak je to odôvodnené.

Médiá a kultivačné podmienky

Na udržiavanie kultúr by sa malo použiť vhodné kultivačné médium a inkubačné podmienky (kultivačné nádoby, podľa potreby atmosféra s vyššou relatívnou vlhkosťou a 5 % CO_2, inkubačná teplota 37 °C). Bunkové línie by sa mali pravidelne kontrolovať, pokiaľ ide o stabilitu modálneho počtu chromozómov a o vylúčenie kontaminácie mykoplazmou (7) (19), a v prípade kontaminácie alebo zmeny modálneho počtu chromozómov by sa nemali použiť. Mal by sa stanoviť čas bežného bunkového cyklu použitej bunkovej línie alebo primárnych kultúr v testovacom laboratóriu a mal by byť zhodný s publikovanými charakteristikami buniek (20).

Príprava kultúr

Bunkové línie: bunky sa množia zo zásobných kultúr, zakladajú sa do rastového média, a to v takej hustote, pri ktorej sa počet buniek v suspenzii alebo v monovrstvách bude ďalej exponenciálne zvyšovať až do času odberu [napr. malo by sa zabrániť zhlukovaniu (konfluencii) buniek rastúcich v monovrstvách].

▼M7

Lymfocyty: celá krv ošetrená antikoagulantom (napríklad: heparínom) alebo separované lymfocyty sa v prítomnosti mitogénu [napr. fytohemaglutinínu (PHA) v prípade ľudských lymfocytov] kultivujú (napr. počas 48 hodín v prípade ľudských lymfocytov), aby sa vyvolalo delenie buniek predtým, ako sa bunky vystavia testovanej chemikálii.

Metabolická aktivácia

Ak sa použijú bunky s nedostatočnou endogénnou metabolickou kapacitou, mali by sa použiť exogénne systémy metabolickej aktivácie. Najpoužívanejším systémom, ktorý sa štandardne odporúča, pokiaľ to nie je odôvodnené inak, je kofaktormi obohatená postmitochondriálna frakcia (S9) pripravená z pečene hlodavcov (väčšinou potkanov) ošetrená činidlami na indukciu enzýmov, ako napríklad Aroclorom 1254 (21) (22) (23) alebo kombináciou fenobarbitálu a beta-naftoflavónu (3-fenyl-1H-nafto[2,1-b]pyrán-1-ón) (27) (28) (29). Uvedená kombinácia nie je v rozpore so Štokholmským dohovorom o perzistentných organických látkach (30) a preukázateľne je pri indukovaní oxidáz so zmiešanými funkciami rovnako účinná ako Aroclor 1254 (24) (25) (26) (28). Frakcia S9 sa zvyčajne používa v koncentráciách v rozpätí od 1 do 2 obj. %, ale v konečnom testovacom médiu ju možno zvýšiť na 10 obj. %. Počas ovplyvňovania by sa malo zabrániť použitiu produktov, ktorými sa znižuje mitotický index, najmä produktov tvoriacich komplexy s vápnikom (31). Výber druhu a koncentrácie použitého exogénneho systému metabolickej aktivácie alebo metabolického induktora môže ovplyvniť trieda testovanej chemikálie.

Príprava testovanej chemikálie

Testované chemikálie v tuhom skupenstve by sa prípadne mali rozpustiť vo vhodnom rozpúšťadle pred ich aplikáciou na bunky (pozri bod 23). Testované chemikálie v kvapalnom skupenstve možno pridať priamo do testovacieho systému a/alebo ich rozriediť pred použitím na ovplyvňovanie testovacieho systému. Plynné alebo prchavé testované chemikálie by sa mali testovať tak, že sa štandardné protokoly vhodne upravia, napríklad sa v nich uskutoční ovplyvňovanie v uzavretých kultivačných nádobách (32) (33) (34). Príprava testovanej chemikálie by sa mala uskutočniť tesne pred ovplyvňovaním, pokiaľ z údajov o stabilite nevyplýva prípustnosť uskladnenia.

Podmienky testu

Rozpúšťadlá

Rozpúšťadlo by sa malo zvoliť tak, aby sa optimalizovala rozpustnosť testovaných chemikálií bez toho, aby to malo negatívny vplyv na vykonávanie skúšky (napr. zmenou rastu buniek), ovplyvňovalo integritu testovanej chemikálie, reagovalo s kultivačnými nádobami, narušovalo systém metabolickej aktivácie. Vždy, keď je to možné, odporúčame zvážiť, aby sa prednostne použilo vodné rozpúšťadlo (alebo rastové médium). Medzi overené rozpúšťadlá patrí napr. voda alebo dimetylsulfoxid. Organické rozpúšťadlá by vo všeobecnosti nemali presiahnuť 1 obj. % a vodné rozpúšťadlá (fyziologický roztok alebo voda) by nemali presiahnuť 10 obj. % v konečnom médiu s testovanou chemikáliou. Ak sa použijú iné ako overené rozpúšťadlá (napr. etanol alebo acetón), ich použitie by malo byť podložené údajmi potvrdzujúcimi ich kompatibilitu s testovanou chemikáliou, testovacím systémom a absenciu genetickej toxicity pri použitej koncentrácii. V prípade, že tieto podkladové údaje nie sú k dispozícii, je dôležité do testu zahrnúť neovplyvňované kontroly (pozri dodatok 1) s cieľom preukázať, že zvolené rozpúšťadlo nevyvoláva žiadne rušivé alebo klastogénne účinky.

Meranie proliferácie buniek a cytotoxicity a výber expozičných koncentrácií

Pri stanovovaní najvyššej koncentrácie testovanej chemikálie by sa malo zabrániť použitiu koncentrácií, ktoré majú schopnosť vyvolať falošné pozitívne reakcie, napr. koncentrácií vyvolávajúcich nadmernú cytotoxicitu (pozri bod 22), zrážanie rastového média (pozri bod 23) alebo výrazné zmeny pH alebo osmolality (pozri

▼M7

bod 5). Ak testovaná chemikália spôsobí výrazné zmeny pH média v čase jej pridania, pH možno upraviť tlmením finálneho média s testovanou chemikáliou tak, aby sa zabránilo falošným pozitívnym výsledkom a aby sa udržali vhodné kultivačné podmienky.

Aby sa zaistilo, že dostatočný počet ovplyvňovaných buniek dosiahol počas testu mitózu a že ošetrenia sa vykonávali na vhodných úrovniach cytotoxicity (pozri body 18 a 22), vykonávajú sa merania proliferácie buniek. V hlavnom experimente by sa mala stanoviť cytotoxicita s metabolickou aktiváciou a bez nej, a to použitím vhodného indikátora bunkovej smrti a rastu. Aj keď z hľadiska lepšieho definovania koncentrácií, ktoré sa majú použiť v hlavnom experimente, môže byť užitočné hodnotenie cytotoxicity v počiatočnom teste, počiatočný test nie je povinný. Ak sa vykonáva, nemal by nahradiť meranie cytotoxicity pri hlavnom experimente.

Relatívne zdvojenie populácie (RPD) alebo relatívne zvýšenie počtu buniek (RICC) sú vhodné metódy na posúdenie cytotoxicity cytogenetických testoch (13) (15) (35) (36) (55) (pozri vzorce v dodatku 2). V prípade dlhodobej aplikácie chemikálie a v prípade, že sa odbery vykonávajú neskôr, ako je 1,5-násobok trvania normálneho bunkového cyklu od začiatku aplikácie (t. j. neskôr, ako je dĺžka 3 bunkových cyklov spolu), môže RPD viesť k podhodnoteniu cytotoxicity. Za týchto okolností by lepšou alternatívou mohlo byť meranie RICC alebo by na vyhodnotenie cytotoxicity po 1,5-násobku trvania bunkového cyklu bolo užitočné použiť odhad pomocou RPD.

Pokiaľ ide o lymfocyty v primárnych kultúrach, meradlom cytotoxických/cytostatických účinkov je mitotický index (MI), ktorý je však ovplyvnený časom od aplikácie testovanej chemikálie do jeho merania použitým mitogénom a prípadným narušením bunkového cyklu. MI je však prijateľný, pretože iné merania cytotoxicity môžu byť náročné a nepraktické a nemusia sa vzťahovať na cieľovú populáciu lymfocytov rastúcich v dôsledku reakcie na stimuláciu pomocou PHA.

Zatiaľ čo v prípade bunkových línií sú odporúčanými parametrami cytotoxicity hodnoty RICC a RPD a v prípade primárnej kultúry lymfocytov sa na rovnaký účel odporúča hodnota MI, užitočné informácie by mohli vyplynúť aj z ďalších ukazovateľov (napr. z integrity buniek, apoptózy, nekrózy, bunkového cyklu).

Mali by sa vyhodnocovať aspoň tri testované koncentrácie (bez zahrnutia kontroly s rozpúšťadlom a pozitívnej kontroly), ktoré spĺňajú kritériá prípustnosti (vhodná cytotoxicita, počet buniek atď.). Pri každej testovanej koncentrácii možno použiť akýkoľvek typ buniek (bunkové línie alebo primárne kultúry lymfocytov), buď replikátne kultúry alebo jednu ovplyvňovanú kultúru. Zatiaľ čo sa odporúča používanie duplikátnych kultúr, jednotlivé kultúry sú rovnako prípustné za predpokladu, že sa hodnotí rovnaký celkový počet buniek v jednotlivých resp. duplikátnych kultúrach. Použitie jednotlivých kultúr je obzvlášť dôležité pri viac ako 3 posudzovaných koncentráciách (pozri bod 31). Výsledky získané v nezávislých replikátnych kultúrach pri danej koncentrácii možno združiť na účely analýzy údajov (38). V prípade testovaných chemikálií, ktoré preukazujú malú alebo žiadnu cytotoxicitu, sú zvyčajne vhodné približne 2 až 3-násobné intervaly testovaných koncentrácií. Pri výskyte cytotoxicity by vybrané

▼M7

testované koncentrácie mali pokrývať rozsah od koncentrácie, ktorá vyvoláva cytotoxicitu, ako sa opisuje v bode 22, vrátane koncentrácií, pri ktorých je cytotoxicita mierna a slabá alebo žiadna. Mnohé testované chemikálie vykazujú strmé krivky závislosti reakcie od koncentrácie a s cieľom získať údaje pri nízkej a miernej cytotoxicite alebo podrobne preskúmať vzťah medzi dávkou a reakciou bude nevyhnutné použiť viac koncentrácií s tesným odstupom a/alebo viac ako tri koncentrácie (pre jednotlivé kultúry alebo replikáty), najmä v situáciách, kde sa vyžaduje opakovať experiment (pozri bod 47).

Ak je maximálna koncentrácia založená na cytotoxicite, najvyššia koncentrácia by mala dosiahnuť 55 ± 5 % cytotoxicity pri použití odporúčaných parametrov cytotoxicity (t. j. v prípade bunkových línií zníženie hodnôt RICC a RPD a v prípade primárnych kultúr lymfocytov zníženie hodnoty MI na 45 ± 5 % hodnôt súbežnej negatívnej kontroly). Pozitívne výsledky, ktoré sa zistia len pri hornej hranici tohto 55 ± 5 % rozpätia cytotoxicity, by sa mali interpretovať s mimoriadnou opatrnosťou (13).

V prípade málorozpustných testovaných chemikálií, ktoré nie sú cytotoxické pri koncentráciách nižších, ako je ich rozpustnosť, by najvyššia analyzovaná koncentrácia mala na konci aplikovania testovanej chemikálie vyvolať zákal alebo zrazeninu viditeľnú voľným okom alebo pomocou inverzného mikroskopu. Aj keď sa cytotoxicita vyskytne pri koncentrácii vyššej, ako je najnižšia nerozpustná koncentrácia daných chemikálií, testovať sa odporúča len pri jednej koncentrácii vyvolávajúcej zákal alebo viditeľnú zrazeninu, pretože falošné účinky môžu byť spôsobené zrazeninou. Pri koncentráciách vyvolávajúcich zrazeninu treba dbať na to, aby nedochádzalo k interferencii zrazeniny s priebehom testu (napr. pri farbení alebo bodovom hodnotení). Mohlo by byť užitočné pred začatím experimentu stanoviť rozpustnosť v rastovom médiu.

Ak sa nezistí žiadna zrazenina alebo obmedzujúca cytotoxicita, najvyššia testovaná koncentrácia by mala zodpovedať 10 mM, 2 mg/ml alebo 2 µl/ml, podľa toho, ktorá je najnižšia (39) (40) (41). Ak testovaná chemikália nemá definované zloženie, napr. látka neznámeho alebo variabilného zloženia, produkt komplexných reakcií alebo biologický materiál (UVCB) (42), environmentálny extrakt atď., je možné, že v prípade nedostatočnej cytotoxicity sa na zvýšenie koncentrácie jednotlivých zložiek danej testovanej chemikálie bude musieť najvyššia koncentrácia zvýšiť (napr. na 5 mg/ml). Je však potrebné poznamenať, že tieto požiadavky sa môžu v prípade humánnych liekov líšiť (43).

Kontroly

Pri každom odbere by sa mali vykonať súbežné negatívne kontroly (pozri bod 15), ktoré pozostávajú iba zo samotného rozpúšťadla v médiu s testovanou chemikáliou a ktoré sú ovplyvňované rovnakým spôsobom ako ovplyvňované kultúry.

Súbežné pozitívne kontroly sú potrebné na preukázanie schopnosti laboratória identifikovať klastogény v podmienkach použitého skúšobného protokolu a v prípade potreby aj (na preukázanie) účinnosti exogénneho systému metabolickej aktivácie. Príklady pozitívnych kontrol sú uvedené v tabuľke 1. Ak je to odôvodnené, možno použiť alternatívne iné chemikálie na pozitívnu kontrolu. Pretože testy genetickej toxicity *in vitro* na bunkách cicavcov sú dostatočne normalizované, použitie pozitívnych kontrol možno obmedziť len na metabolickú aktiváciu, ktorá si vyžaduje klastogén. Za predpokladu, že sa takýto test vykonáva súbežne s neaktivovaným testom s použitím rovnakej dĺžky ovplyvňovania, táto jediná pozitívna reakcia kontroly bude preukazovať aktivitu systému metabolickej aktivácie, ako aj citlivosť testovacieho systému. Dlhodobé ovplyvňovanie (bez S9) by však malo mať svoju vlastnú pozitívnu kontrolu, keďže dĺžka ovplyvňovania sa bude líšiť od testu s metabolickou aktiváciou. Každá pozitívna kontrola by sa mala použiť pri jednej alebo viacerých koncentráciách, pri ktorých sa očakáva reprodukovateľný a zistiteľný nárast nad hodnoty v pozadí, aby sa preukázala citlivosť testovacieho systému (t. j. aby účinky boli jasné, ale aby sa pri odčítavaní priamo neodhaľovala identita kódovaných preparátov), pričom by reakcia nemala byť narušená cytotoxicitou prevyšujúcu limity stanovené v testovacej metóde.

▼M7

Tabuľka 1

Referenčné chemikálie odporúčané na posúdenie spôsobilosti laboratória a na výber pozitívnych kontrol.

Kategória	Chemikália	Číslo CAS
1. Klastogény aktívne bez metabolickej aktivácie		
	metylmetánsulfonát	66-27-3
	mitomycín C	50-07-7
	4-nitrochinolín-*N*-oxid	56-57-5
	cytarabín	147-94-4
2. Klastogény vyžadujúce metabolickú aktiváciu		
	benzo[a]pyrén	50-32-8
	cyklofosfamid	50-18-0

POSTUP

Aplikácia testovanej chemikálie

Proliferujúce bunky sa ovplyvnia testovanou chemikáliou za prítomnosti aj za neprítomnosti systému metabolickej aktivácie.

Čas odberu kultúry

Na účely dôkladného vyhodnotenia, ktoré by bolo potrebné na vyslovenie záveru, že ide o negatívny výsledok, by sa mali vykonať testy za všetkých troch ďalej uvedených experimentálnych podmienok, a to s použitím krátkodobého ovplyvňovania testovanou chemikáliou spolu s metabolickou aktiváciou alebo bez nej a s použitím dlhodobého ovplyvňovania testovanou chemikáliou bez metabolickej aktivácie (pozri body 43, 44 a 45):

— Bunky by sa mali vystaviť testovanej chemikálii bez metabolickej aktivácie na 3 – 6 hodín, a vzorky z nich by sa mali odobrať v čase ekvivalentnom približne 1,5-násobku dĺžky bežného bunkového cyklu po začatí ovplyvňovania (18).

— Bunky by sa mali vystaviť testovanej chemikálii spolu s metabolickou aktiváciou na 3 – 6 hodín, a vzorky z nich by sa mali odobrať v čase ekvivalentnom približne 1,5-násobku dĺžky bežného bunkového cyklu po začatí ovplyvňovania (18).

— Bunky by sa mali nepretržite vystavovať testovanej chemikálii bez metabolickej aktivácie až do odobratia vzorky v čase ekvivalentnom približne 1,5-násobku dĺžky bežného bunkového cyklu. Určité chemikálie (napr. analógy nukleozidov) sa dajú jednoduchšie zistiť pri dlhšom ovplyvňovaní resp. pri odoberaní vzoriek v čase dlhšom, ako je 1,5-násobok dĺžky bežného bunkového cyklu (24).

V prípade, že ktorákoľvek z uvedených experimentálnych podmienok vedie k pozitívnej reakcii, nie je potrebné preskúmať ostatné dávkovacie schémy.

Chromozómové preparáty

Bunkové kultúry sa ošetrujú kolcemidom alebo kolchicínom zvyčajne 1 – 3 hodiny pred odberom. Každá bunková kultúra sa na prípravu chromozómových preparátov odoberá a spracúva oddelene. Príprava chromozómových preparátov zahŕňa hypotonické ošetrenie buniek, fixáciu a farbenie. V monovrstvových bunkových kultúrach sa mitotické bunky (možno ich identifikovať ako okrúhle a oddeľujúce sa od povrchu) môžu vyskytovať na konci 3 – 6 hodinového pôsobenia. Keďže sa tieto mitotické bunky dajú ľahko oddeliť, môžu sa stratiť

▼M7

pri odstraňovaní média obsahujúceho testovanú chemikáliu. Ak v čase odberu existuje dôkaz o výraznom zvýšení počtu mitotických buniek v porovnaní s kontrolami, čo by poukazovalo na možné zastavenie mitózy, potom by sa bunky mali zhromaždiť odstreďovaním a vrátiť späť ku kultúram, aby sa predišlo strate buniek v mitóze, ktorým hrozí vznik chromozómových aberácií.

Analýza

Všetky preparáty vrátane preparátov s negatívnymi a pozitívnymi kontrolami by sa pred mikroskopickou analýzou chromozómových aberácií mali nezávisle označiť kódmi. Keďže fixačné postupy často vedú k tomu, že časť metafázových buniek stratí chromozómy, vyhodnocované bunky by preto mali obsahovať centroméry, ktorých počet by sa mal rovnať modálnemu počtu chromozómov ± 2.

Hodnotiť by sa malo najmenej 300 dobre rozotretých buniek v metafáze na jednu koncentráciu a kontrolu, aby bolo možné dôjsť k záveru, že testovaná chemikália je jednoznačne negatívna (pozri bod 45). V prípade používania replikátnych kultúr by sa uvedených 300 buniek malo rovnomerne rozdeliť medzi replikáty. Ak sa pri každej koncentrácii použije len jedna kultúra (pozri bod 21), uvedených najmenej 300 dobre rozprestrených buniek v metafáze by sa malo hodnotiť z tejto jednej kultúry. Prednosťou hodnotenia 300 buniek je zvyšovanie štatistickej sily testu, pričom sa okrem toho zriedka vyskytnú nulové hodnoty (predpokladá sa len 5 %) (44). Počet hodnotených metafáz možno znížiť, ak sa zistí veľký počet buniek s chromozómovými aberáciami a testovaná chemikália sa považuje za jasne pozitívnu.

Mali by sa hodnotiť bunky so štruktúrnymi chromozómovými aberáciami, a to s gapmi a bez gapov. Definície zlomov a gapov sú uvedené v dodatku 1, podľa (45) (46). Aberácie chromatídového a chromozómového typu by sa mali zaznamenávať oddelene a klasifikovať podľa druhu (zlomy, výmeny). Postupy používané v laboratóriu by mali zabezpečiť, aby analýzy chromozómových aberácií vykonávali primerane vyškolení hodnotiaci pracovníci a aby sa podľa potreby partnersky preskúmali.

Hoci účelom tohto testu je zistiť štruktúrne chromozómové aberácie, v prípade polyploidie a endoreduplikácie je dôležité zaznamenať frekvenciu týchto javov. (pozri bod 2).

Spôsobilosť laboratória

V záujme nadobudnutia dostatočných skúseností s testom pred jeho použitím na rutinné testovanie by laboratórium malo mať uskutočnené série experimentov s referenčnými pozitívnymi chemikáliami pôsobiacimi rôznymi mechanizmami a s rôznymi negatívnymi kontrolami (s použitím rôznych rozpúšťadiel/nosičov). Tieto reakcie pozitívnych a negatívnych kontrol by mali byť konzistentné s literatúrou. Táto požiadavka sa nevzťahuje na laboratóriá, ktoré majú skúsenosti, t. j. majú dostupnú historickú databázu, ako sa vymedzuje v bode 37.

Na preukázanie spôsobilosti detegovať klastogénne chemikálie a určiť účinnosť systému metabolickej aktivácie by sa mal preskúmať výber chemikálií na pozitívnu kontrolu (pozri tabuľku 1 v bode 26), a to na základe krátkodobého a dlhodobého ovplyvňovania bez metabolickej aktivácie, ako aj na základe krátkodobého pôsobenia za prítomnosti metabolickej aktivácie. V záujme preukázania citlivosti a dynamického rozsahu testovacieho systému by sa rozsah koncentrácií vybraných chemikálií mal zvoliť tak, aby vznikali reprodukovateľné reakcie zvyšujúce sa v závislosti od koncentrácie nad úrovňou v pozadí.

▼M7

Historické údaje o kontrolách

Laboratórium by malo vytvoriť:

— rozsah a rozdelenie historických pozitívnych kontrol,

— rozsah a rozdelenie historických negatívnych kontrol (neovplyvňované, s rozpúšťadlom).

Pri prvom získavaní údajov súvisiacich s rozdelením historických negatívnych kontrol by súbežné negatívne kontroly mali byť v súlade s uverejnenými údajmi kontrol, ak takéto údaje existujú. S pridávaním ďalších experimentálnych údajov k rozdeleniu kontrol by súbežné negatívne kontroly mali byť v ideálnom prípade v rámci 95 % regulačných medzí tohto rozdelenia (44) (47). Historickú databázu negatívnych kontrol laboratória by na začiatku malo tvoriť minimálne 10 experimentov, ale podľa možnosti by mala pozostávať aspoň z 20 experimentov vykonaných za porovnateľných experimentálnych podmienok. Laboratóriá by mali použiť metódy kontroly kvality, ako sú regulačné diagramy [napr. tzv. „C-charts“ alebo „X-bar charts“ (48)], s cieľom zistiť variabilitu svojich údajov týkajúcich sa pozitívnych a negatívnych kontrol a preukázať, že metodika v ich laboratóriu je „pod kontrolou“ (44). Ďalšie odporúčania k vytváraniu a využívaniu historických údajov (t. j. kritériá zaradenia údajov medzi historické údaje a ich vylúčenia z historických údajov a kritériá prijateľnosti v prípade daného experimentu) možno nájsť v literatúre (47).

Všetky zmeny v experimentálnom protokole by sa mali posúdiť z hľadiska ich súladu s existujúcou historickou databázou kontrol laboratória. Akékoľvek závažné nezrovnalosti by mali vyústiť do vytvorenia novej historickej databázy kontrol.

Údaje týkajúce sa negatívnych kontrol by mali zahŕňať výskyt buniek s chromozómovými aberáciami z jednej kultúry alebo súčet z replikátov kultúr, ako je opísané v bode 21. Súbežné negatívne kontroly by v ideálnom prípade mali byť v rámci 95 % regulačných medzí rozloženia historickej databázy negatívnych kontrol laboratória (44) (47). Ak údaje zo súbežných negatívnych kontrol nespadajú do 95 % regulačných medzí, môžu byť prijateľné na zaradenie do rozloženia historických kontrol, pokiaľ tieto údaje nie sú extrémne odľahlými hodnotami a pokiaľ existujú dôkazy, že testovací systém je „pod kontrolou“ (pozri bod 37) a neexistujú žiadne dôkazy o technickom alebo ľudskom zlyhaní.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Prezentovanie výsledkov

Vyhodnotiť by sa mal percentuálny podiel buniek so štruktúrnou chromozómovou aberáciou(-ami). Aberácie chromatídového a chromozómového typu klasifikované podľa druhu (zlomy, výmeny) by mali byť uvedené oddelene spolu s ich počtami a frekvenciami výskytu v prípade experimentálnych a kontrolných kultúr. Gapy sa zaznamenávajú a uvádzajú oddelene, ale neudávajú sa pri celkovej frekvencii aberácií. Uvádza sa percentuálny podiel polyploidie a/alebo endoreduplikovaných buniek, ak boli pozorované.

Mali by sa zaznamenať súbežné merania cytotoxicity pre všetky ovplyvňované, ako aj negatívne a pozitívne kontrolné kultúry v hlavnom experimente zameranom na aberácie.

Mali by sa uvádzať údaje o jednotlivých kultúrach. Okrem toho by sa všetky údaje mali uvádzať v tabuľkovej podobe.

Kritériá prijateľnosti

Prijateľnosť vychádza z týchto kritérií:

— Súbežná negatívna kontrola sa považuje za prijateľnú na doplnenie do historickej databázy negatívnych kontrol laboratória, ako je opísané v bode 39.

▼M7

— Súbežné pozitívne kontroly by mali vyvolať reakcie, ktoré sú zlučiteľné s reakciami generovanými v historickej databáze pozitívnych kontrol a viesť k štatisticky významnému nárastu v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou.

— Kritériá proliferácie buniek v kontrole s rozpúšťadlom by mali byť splnené (body 17 a 18).

— Pokiaľ jedna experimentálna podmienka neviedla k pozitívnym výsledkom (pozri bod 28), testovali sa všetky tri experimentálne podmienky.

— Analyzovateľný je adekvátny počet buniek a koncentrácií (body 31 a 21).

— Kritériá výberu najvyššej koncentrácie sú v súlade s kritériami opísanými v bodoch 22, 23 a 24.

Vyhodnotenie a interpretácia výsledkov

Za predpokladu, že všetky kritériá prijateľnosti sú splnené, sa testovaná chemikália pokladá za jasne pozitívnu, ak pre ktorúkoľvek z preskúmaných experimentálnych podmienok platí, že (pozri bod 28):

a) aspoň jedna z testovaných koncentrácií vykazuje štatisticky významné zvýšenie v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

b) toto zvýšenie je závislé od dávky, ak sa hodnotenie vykonáva na základe vhodného testu trendu,

c) niektorý z týchto výsledkov je mimo rozloženia historických údajov týkajúcich sa negatívnych kontrol (napr. mimo 95 % regulačných medzí Poissonovho rozdelenia, pozri bod 39).

Ak sú splnené všetky tieto kritériá, potom sa testovaná chemikália považuje za schopnú vyvolať chromozómové aberácie v kultivovaných bunkách cicavcov v tomto testovacom systéme. Odporúčania týkajúce sa najvhodnejších štatistických metód možno nájsť v literatúre (49) (50) (51).

Za predpokladu, že všetky kritériá prijateľnosti sú splnené, sa testovaná chemikália pokladá za jasne negatívnu, ak pri všetkých preskúmaných experimentálnych podmienkach (pozri bod 28) platí, že:

a) žiadna z testovaných koncentrácií nevykazuje štatisticky významné zvýšenie v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

b) nedochádza k zvýšeniu závislému od dávky, ak sa hodnotenie vykonáva na základe vhodného testu trendu,

c) všetky výsledky sa vyskytujú v rámci rozložení historických údajov týkajúcich sa negatívnych kontrol (napr. v 95 % regulačných medziach Poissonovho rozdelenia, pozri bod 39).

Testovaná chemikália sa považuje za neschopnú vyvolať chromozómové aberácie v kultivovaných bunkách cicavcov v tomto testovacom systéme.

Overenie jasnej pozitívnej alebo negatívnej reakcie sa nevyžaduje.

V prípade, že reakcia nie je jednoznačne negatívna, ani jednoznačne pozitívna podľa uvedeného opisu, alebo v prípade, že ide o pomoc pri stanovovaní biologickej relevantnosti výsledku, by sa údaje mali odborne posúdiť a/alebo podrobiť ďalšiemu skúmaniu. Užitočné by mohlo byť hodnotenie ďalších buniek (ak je to vhodné) alebo opakovanie experimentu podľa možnosti za modifikovaných experimentálnych podmienok [napr. odstup koncentrácií, iné podmienky metabolickej aktivácie (t. j. koncentrácia S9 alebo pôvod S9)].

V zriedkavých prípadoch, dokonca aj po ďalších skúmaniach, z údajov nemožno vyvodiť záver o tom, či sú výsledky pozitívne alebo negatívne, a preto sa reakcia na testovanú chemikáliu uzavrie ako reakcia s nejasným výsledkom.

▼M7

Nárast počtu polyploidných buniek môže naznačovať, že testované chemikálie majú potenciál brzdiť mitotické procesy a indukovať numerické chromozómové aberácie (52). Nárast počtu buniek s endoreduplikovanými chromozómami môže naznačovať, že testované chemikálie majú potenciál brzdiť priebeh bunkového cyklu (53) (54) (pozri bod 2). Preto by sa incidencia polyploidných buniek a buniek s endoreduplikovanými chromozómami mala zaznamenávať oddelene.

Skúšobný protokol

Skúšobný protokol by mal zahŕňať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— zdroj, číslo šarže, konečný dátum použitia, ak sú tieto informácie k dispozícii,

— stabilita samotnej testovanej chemikálie, ak je známa,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle, ak je známa,

— výsledky merania pH, osmolality a tvorby zrazeniny v rastovom médiu, ku ktorej bola pridaná testovaná chemikália, podľa vhodnosti.

Jednozložková látka:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— chemická identifikácia ako názov IUPAC alebo názov CAS, CAS číslo, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt podľa vhodnosti a praktickej realizovateľnosti atď.

Viaczložková látka, UVCB a zmesi:

— čo najviac charakterizované chemickou identitou (pozri vyššie), kvantitatívnym výskytom a príslušnými fyzikálno-chemickými vlastnosťami zložiek.

Rozpúšťadlo:

— zdôvodnenie výberu rozpúšťadla,

— percentuálny podiel rozpúšťadla v konečnom rastovom médiu by sa mal takisto uviesť.

Bunky:

— typ a zdroj buniek,

— karyotyp a vhodnosť použitého typu buniek,

— v prípade bunkových línií neprítomnosť mykoplazmy,

— v prípade bunkových línií informácie o dĺžke bunkového cyklu, čase zdvojenia alebo proliferačnom indexe,

— pohlavie darcov krvi, vek a akékoľvek relevantné informácie o darcovi, či ide o celú krv alebo separované lymfocyty, použitý mitogén,

— v prípade bunkových línií počet pasážovaní, ak je k dispozícii,

— v prípade bunkových línií metódy udržiavania bunkovej kultúry,

— v prípade bunkových línií modálny počet chromozómov.

▼**M7**

Podmienky testu:

— identita chemikálie zastavujúcej metafázu, jej koncentrácia a trvanie expozície buniek,

— koncentrácia testovanej chemikálie vyjadrená ako konečná koncentrácia v rastovom médiu (napr. µg alebo mg/ml alebo mM rastového média),

— zdôvodnenie výberu koncentrácií a počtu kultúr vrátane napríklad údajov o cytotoxicite a obmedzení rozpustnosti,

— zloženie média, v prípade vhodnosti koncentrácia CO_2, úroveň vlhkosti,

— koncentrácia (a/alebo objem) rozpúšťadla a testovanej chemikálie pridaných do rastového média,

— inkubačná teplota,

— inkubačný čas,

— trvanie ovplyvňovania,

— čas odberu po ovplyvňovaní,

— hustota buniek pri zakladaní do rastového média, ak je to vhodné,

— typ a zloženie systému metabolickej aktivácie (zdroj S9, metóda prípravy zmesi S9, koncentrácia alebo objem zmesi S9 a S9 v konečnom rastovom médiu, kontroly kvality S9),

— chemikálie na pozitívnu a negatívnu kontrolu, konečné koncentrácie pre každú z podmienok ovplyvňovania;

— použité metódy prípravy preparátov a metóda farbenia,

— kritériá prijateľnosti skúšky,

— kritériá pre hodnotenie aberácií,

— počet analyzovaných metafáz,

— metódy merania cytoxicity,

— všetky doplňujúce informácie týkajúce sa cytotoxicity a použitej metódy,

— kritériá považovanie štúdií za pozitívne, negatívne alebo nejasné,

— metódy použité na určenie pH, osmolality a zrážania.

Výsledky:

— v prípade bunkových línií počet ovplyvňovaných buniek a počet odobratých buniek za každú kultúru,

— meranie cytotoxicity, napr. RPD, RICC, MI, ďalšie pozorovania, ak existujú,

— v prípade bunkových línií informácie o dĺžke bunkového cyklu, čase zdvojenia alebo proliferačnom indexe,

— príznaky tvorby zrazeniny a čas jej stanovenia,

▼M7

— definícia aberácií vrátane gapov,

— počet hodnotených buniek, počet buniek s chromozómovými aberáciami a typ chromozómových aberácií uvedené oddelene pre každú ovplyvňovanú a kontrolnú kultúru spolu s gapmi a bez gapov,

— zmeny v ploidii (polyploidné bunky a bunky s endoreduplikovanými chromozómami uvedené oddelene), ak boli pozorované,

— vzťah medzi koncentráciou a reakciou, ak ho možno určiť,

— údaje týkajúce sa súbežných negatívnych (rozpúšťadlo) a pozitívnych kontrol (koncentrácie a rozpúšťadlá),

— historické údaje týkajúce sa negatívnych (rozpúšťadlo) a pozitívnych kontrol spolu s rozsahmi, priemermi, so štandardnými odchýlkami, s 95 % regulačnými medzami rozdelenia a počtom údajov,

— štatistická analýza, p-hodnoty, ak existujú.

Výsledky a diskusia

Záver

LITERATÚRA

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. Kapitola B.49 tejto prílohy: Mikrojadrový test cicavcov *in vitro*.

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 Mutagenesis*, 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 Research*, Vol. 37/1, pp. 83-90.

24. Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro, Mutation Research/ Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, pp. 277-290.

25. Ong, T.-m. *et al.* (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, pp. 55-65.

26. Elliot, B.M. *et al.* (1992), Report of 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), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). K dispozícii na webovej lokalite: 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. K dispozícii na požiadanie.

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. K dispozícii na webovej lokalite: 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 Research*, Vol. 312, pp. 139-149.

▼M7

Dodatok 1

DEFINÍCIE

Aneuploidia: akákoľvek odchýlka od bežného diploidného (alebo haploidného) počtu chromozómov vo forme jedného alebo viacerých chromozómov, nie však vo forme celého súboru(-ov) chromozómov (polyploidia).

Apoptóza: programovaná bunková smrť charakterizovaná sériou krokov, ktoré vedú k rozpadu buniek na telieska ohraničené membránou, ktoré sa následne fagocytujú alebo vypudzujú.

Proliferácia buniek: zvýšenie počtu buniek v dôsledku mitotického delenia bunky.

Chemikália: látka alebo zmes.

Chromatidový zlom: prerušenie jednej chromatídy so zjavným posunutím jednej z chromatíd.

Chromatidový gap: nefarbiaca sa oblasť (achromatická lézia) jednej chromatídy s minimálnym posunutím chromatíd.

Aberácia chromatidového typu: štruktúrne chromozómové poškodenie prejavujúce sa ako zlom jednej z chromatíd alebo zlom a opätovné spojenie medzi chromatídami.

Aberácia chromozómového typu: štruktúrne chromozómové poškodenie prejavujúce sa ako zlom alebo zlom a opätovné spojenie oboch chromatíd na rovnakej strane.

Klastogén: každá chemikália, ktorá spôsobuje štruktúrne chromozómové aberácie v populáciách buniek alebo eukaryotických organizmov.

Koncentrácie: odkaz na konečné koncentrácie testovanej chemikálie v rastovom médiu.

Cytotoxicita: V prípade skúšok uvedených v tejto testovacej metóde s využitím bunkových línií je cytotoxicita identifikovaná ako zníženie relatívneho zdvojenia populácie (RPD) alebo relatívne zvýšenie počtu buniek (RICC), pokiaľ ide o ovplyvňované bunky v porovnaní s negatívnou kontrolnou (pozri bod 17 a dodatok 2). V prípade skúšok uvedených v tejto testovacej metóde s využitím primárnych kultúr lymfocytov je cytotoxicita identifikovaná ako zníženie mitotického indexu (MI) ošetrených buniek v porovnaní s negatívnou kontrolnou (pozri bod 18 a dodatok 2).

Endoreduplikácia: proces, v ktorom po S fáze replikácie DNA jadro neprechádza do mitózy, ale začína ďalšiu S fázu. Výsledkom sú chromozómy so 4, 8, 16… chromatídami.

Genotoxický: všeobecný pojem, ktorý zahŕňa všetky typy poškodení DNA alebo chromozómov vrátane zlomov, delécií, aduktov, modifikácií a spojení nukleotidov, prestavby, génových mutácií, chromozómových aberácií a aneuploidie. Nie všetky typy genotoxických účinkov majú za následok mutácie alebo trvalé poškodenie chromozómu.

Mitotický index (MI): pomer medzi počtom buniek v metafáze a celkovým počtom buniek v populácii buniek, ktorý je meradlom stupňa proliferácie tejto populácie.

Mitóza: delenie bunkového jadra, ktoré sa zvyčajne delí na profázu, prometafázu, metafázu, anafázu a telofázu.

Mutagénny: produkujúci dedičnú zmenu sekvencie(-í) bázových párov DNA v génoch alebo štruktúre chromozómov (chromozómové aberácie).

▼M7

Numerická aberácia: zmena v počte chromozómov v porovnaní s bežným počtom charakteristickým pre použité bunky.

Polyploidia: numerické chromozómové aberácie v bunkách alebo organizmoch, ktoré sa týkajú celého súboru(-ov) chromozómov na rozdiel od jednotlivého chromozómu alebo chromozómov (aneuploidia).

Stav p53: proteín p53 je zapojený do regulácie bunkového cyklu, apoptózy a opravy DNA. Bunky s nedostatkami vo funkčnom proteíne p53, ktoré nie sú schopné zastaviť bunkový cyklus alebo odstrániť poškodené bunky prostredníctvom apoptózy alebo iných mechanizmov (napr. indukciou opravy DNA) súvisiacich s funkciami p53 pri reakcii na poškodenie DNA, by mali byť teoreticky náchylnejšie na génové mutácie či chromozómové aberácie.

Relatívne zvýšenie počtu buniek (Relative Increase in Cell Counts, RICC): zvýšenie počtu buniek v kultúrach vystavených chemikálii voči zvýšeniu v neošetrených kultúrach, pomer vyjadrený v percentách.

Relatívne zdvojenie populácie (Relative Population Doubling, RPD): zvýšenie počtu zdvojení populácie v kultúrach vystavených chemikálii voči zvýšeniu v neošetrených kultúrach, pomer vyjadrený v percentách.

Frakcia pečene S9: supernatant homogenátu pečene po odstredení pri 9 000 g, t. j. surový pečeňový extrakt.

Zmes S9: zmes frakcie pečene S9 a kofaktorov potrebných pre aktivitu metabolických enzýmov

Kontrola s aplikovaným rozpúšťadlom: všeobecný pojem na vymedzenie kontrolných kultúr, na ktoré bolo aplikované samotné rozpúšťadlo, ktoré bolo použité na rozpustenie testovanej chemikálie.

Štruktúrna chromozómová aberácia: zmena v chromozómovej štruktúre rozpoznateľná mikroskopickým skúmaním metafázového štádia delenia buniek, pozorovaná ako delécie a fragmenty, intrachromozómové výmeny alebo interchromozómové výmeny.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje touto testovacou metódou.

Neošetrené kontroly: kultúry, ktoré sa neovplyvňujú (t. j. ani testovanou chemikáliou ani rozpúšťadlom), ale súbežne sa spracúvajú rovnakým spôsobom ako kultúry ovplyvňované testovanou chemikáliou.

▼M7

Dodatok 2

VZORCE NA POSÚDENIE CYTOTOXICITY

Mitotický index (MI):

$$\mathbf{MI}(\%) = \frac{\text{Number of mitotic cells}}{\text{Total number of Cells scored}} \times 100$$

Odporúča sa použiť **relatívne zvýšenie počtu buniek (RICC)** alebo **relatívne zdvojenie populácie (RPD)**, pretože obidva indexy zohľadňujú pomer populácie buniek, u ktorých došlo k deleniu.

$$\mathbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{Increase in number of cells in treated cultures}(\text{final} - \text{starting}))}{(\text{Increase in numbers of cells in control cultures}(\text{final} - \text{starting}))} \times 100$$

$$\mathbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{No. of Population doublings in treated cultures})}{(\text{No. of population doublings in control cultures})} \times 100$$

kde:

Zdvojenie populácie = [log (počet buniek po ošetrení ÷ počiatočný počet buniek)] ÷ log 2.

Napríklad hodnota 53 % RICC alebo RDP poukazuje na 47 % cytotoxicitu/cytostázu a 55 % cytotoxicita/cytostáza meraná prostredníctvom MI znamená, že skutočný MI predstavuje 45 % kontroly.

V každom prípade by sa mal merať počet buniek pred ovplyvňovaním, ako aj počet buniek v ovplyvňovaných a negatívnych kontrolných kultúrach.

Hoci sa pomer RCC (t. j. počet buniek v ovplyvňovaných kultúrach/počet buniek v kontrolných kultúrach) v minulosti používal ako parameter cytotoxicity, už sa viac neodporúča, pretože sa ním môže podceniť cytotoxicita.

V negatívnych kontrolných kultúrach by zdvojenie populácie malo byť zlučiteľné s požiadavkou na odber vzorky buniek po ovplyvňovaní v čase ekvivalentnom približne 1,5-násobku dĺžky bežného bunkového cyklu a mitotický index by mal byť dostatočne zvýšený na získanie dostatočného počtu buniek v mitóze a na spoľahlivé vypočítanie 50 % zníženia.

▼M7

B.11. TEST NA CHROMOZÓMOVÉ ABERÁCIE V CICAVČÍCH BUNKÁCH KOSTNEJ DRENE

ÚVOD

Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov 475 (2016). Je súčasťou série testovacích metód v oblasti genetickej toxikológie. V tejto súvislosti bol vypracovaný aj dokument OECD, ktorý poskytuje stručné informácie o vykonávaní testov v oblasti genetickej toxikológie a prehľad o súčasných zmenách, ktorými tieto usmernenia na vykonávanie testov prešli (1).

Tento *in vivo* test na chromozómové aberácie v cicavčích bunkách kostnej drene je osobitne relevantný pre posúdenie genotoxicity, pretože faktory ako *in vivo* metabolizmus, farmakokinetika a oprava DNA sú aktívne a prispievajú k reakciám, hoci sa v prípade rôznych druhov môžu líšiť. Skúška *in vivo* je užitočná aj pre ďalšie skúmanie genotoxicity zistenej pomocou *in vitro* systému.

Test na chromozómové aberácie v cicavčích bunkách *in vivo* sa používa na zisťovanie štruktúrnych chromozómových aberácií indukovaných testovanou chemikáliou v bunkách kostnej drene zvierat, zvyčajne hlodavcov (2) (3) (4) (5). Štruktúrne chromozómové aberácie sa vyskytujú v dvoch typoch, chromozómové alebo chromatidové. Zatiaľ čo väčšina aberácií indukovaných genotoxickou chemikáliou je chromatidového typu, vyskytujú sa aj aberácie chromozómového typu. Chromozómové poškodenia a súvisiace javy sú príčinou mnohých ľudských genetických chorôb a existujú dostatočné dôkazy o tom, že pokiaľ tieto lézie a súvisiace javy spôsobujú zmeny onkogénov a tumor supresorových génov, sú zapojené do vzniku rakoviny u ľudí a v pokusných systémoch. V *in vivo* testoch na chromozómové aberácie by mohla vzniknúť polyploidia (vrátane endoreduplikácie). Samotné zvýšenie polyploidie však nenaznačuje aneugénny potenciál a môže jednoducho znamenať narušenie bunkového cyklu alebo cytotoxicitu. Tento test nie je určený na meranie aneuploidie. Na detekciu aneuploidie sa odporúčajú *in vivo* a *in vitro* testy ako *in vivo* mikrojadrový test na erytrocytoch cicavcov (kapitola B.12 tejto prílohy) alebo *in vitro* mikrojadrový test bunkách cicavcov (kapitola B.49 tejto prílohy).

Použité definície termínov sú uvedené v dodatku 1.

ÚVODNÉ ÚVAHY

V tomto teste sa zvyčajne používajú hlodavce, ale ak je to vedecky opodstatnené, v niektorých prípadoch môžu byť vhodné aj iné druhy. Cieľovým tkanivom v tomto teste je kostná dreň, pretože je to vysokovaskularizovaným tkanivom a obsahuje populáciu rýchlo sa deliacich buniek, ktoré sa dajú jednoducho izolovať a spracovať. V správe by sa malo uviesť vedecké odôvodnenie použitia iných druhov než potkanov a myší. Ak sa použijú iné druhy než hlodavce, odporúča sa, aby sa meranie chromozómových aberácií v bunkách kostnej drene začlenilo do iného vhodného testu toxicity.

Ak existujú dôkazy, že testovaná chemikália, resp. testované chemikálie alebo ich metabolity nedosiahnu cieľové tkanivo, použitie tohto testu nemusí byť vhodné.

Pred použitím testovacej metódy v prípade zmesi s cieľom generovať údaje pre zamýšľaný regulačný účel by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť primerané výsledky na tento účel, a ak môže, malo by sa to zdôvodniť. Takéto úvahy nie sú potrebné, ak existuje regulačná požiadavka na testovanie zmesi.

▼M7

PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Zvieratá sa testovanej chemikálii vystavia vhodnou cestou a vo vhodnom čase po aplikácii testovanej chemikálie sa humánne usmrtia. Pred usmrtením sa zvieratám aplikuje prostriedok zastavujúci metafázu (napr kolchicín alebo kolcemid). Následne sa z kostnej drene urobia chromozómové preparáty, zafarbia sa a bunky v metafáze sa analyzujú na chromozómové aberácie.

OVEROVANIE SPÔSOBILOSTI LABORATÓRIA

Zisťovanie spôsobilosti

V záujme nadobudnutia dostatočných skúseností s vykonávaním skúšky pred jej použitím na rutinné testovanie by laboratórium malo preukázať schopnosť reprodukovať výsledky predpokladané na základe zverejnených údajov [napr. (6)], pokiaľ ide o frekvenciu výskytu chromozómových aberácií, s minimálne dvomi chemikáliami na pozitívnu kontrolu (vrátane slabých reakcií indukovaných nízkymi dávkami pozitívnych kontrol), ako sú chemikálie uvedené v tabuľke 1, a s kompatibilnými kontrolami s nosičom/rozpúšťadlom (pozri bod 22). Pri týchto experimentoch by sa mali používať dávky, ktoré vyvolajú reprodukovateľný a od dávky závislý nárast účinku a preukážu citlivosť a dynamický rozsah testovacieho systému v predmetnom tkanive (kostná dreň), pričom sa použije metóda hodnotenia, ktorá sa má uplatňovať v laboratóriu. Táto požiadavka sa nevzťahuje na laboratóriá, ktoré majú skúsenosti, t. j. majú dostupnú historickú databázu, ako sa vymedzuje v bodoch 10 – 14.

Historické údaje o kontrolách

V priebehu zisťovania spôsobilosti by malo laboratórium určiť:

— rozsah a rozdelenie historických pozitívnych kontrol a

— rozsah a rozdelenie historických negatívnych kontrol.

Pri prvom získavaní údajov súvisiacich s rozdelením historických negatívnych kontrol by súbežné negatívne kontroly mali byť v súlade s uverejnenými údajmi týkajúcimi sa kontrol, ak takéto údaje existujú. S pridávaním ďalších experimentálnych údajov k rozdeleniu historických kontrol by súbežné negatívne kontroly mali byť v ideálnom prípade v rámci 95 % regulačných medzí tohto rozdelenia. Historická databáza negatívnych kontrol laboratória by mala byť štatisticky solídna, aby sa zaistila schopnosť laboratória posudzovať rozdelenie jeho údajov týkajúcich sa negatívnych kontrol. Na základe literatúry môže byť potrebných minimálne 10 experimentov, no bolo by vhodnejšie vykonať aspoň 20 experimentov za porovnateľných experimentálnych podmienok. Laboratóriá by mali používať metódy kontroly kvality, ako sú regulačné diagramy [napr. tzv. „C-charts“ alebo „X-bar charts“ (7)], s cieľom zistiť variabilitu svojich údajov a preukázať, že metodika v ich laboratóriu je „pod kontrolou“. Ďalšie odporúčania k vytváraniu a využívaniu historických údajov (t. j. kritériá zaradenia údajov medzi historické údaje a ich vylúčenia z historických údajov a kritériá prijateľnosti v prípade daného experimentu) možno nájsť v literatúre (8).

Ak laboratórium nevykoná dostatočný počet experimentov na vytvorenie štatisticky solídneho rozdelenia negatívnych kontrol (pozri bod 11) počas zisťovania spôsobilosti (ako sa opisuje v bode 9), je prijateľné, aby sa rozdelenie vytváralo počas prvých rutinných testov. Tento postup by mal vychádzať z odporúčaní uvedených v literatúre (8) a výsledky negatívnych kontrol získané na základe týchto experimentov by mali zostať v súlade s uverejnenými údajmi týkajúcimi sa negatívnych kontrol.

▼M7

Všetky zmeny v experimentálnom protokole by sa mali posúdiť z hľadiska ich vplyvu na výsledné údaje, ktoré musia zostať v súlade s existujúcou historickou databázou kontrol laboratória. K vytvoreniu novej historickej databázy kontrol by mali viesť len veľké rozdiely, ak sa na základe odborného posúdenia stanoví, že sa líši od predchádzajúceho rozdelenia (pozri bod 11). Počas tejto obnovy nemusí byť na vykonanie príslušného testu potrebná úplná databáza negatívnych kontrol, ak laboratórium vie preukázať, že jeho hodnoty súbežných negatívnych kontrol sú naďalej v súlade s jeho predchádzajúcou databázou alebo s príslušnými uverejnenými údajmi.

Údaje týkajúce sa negatívnych kontrol by mali zahŕňať údaje o výskyte štruktúrnych chromozómových aberácií (s výnimkou gapov) u každého zvieraťa. Súbežné negatívne kontroly by v ideálnom prípade mali byť v rámci 95 % regulačných medzí rozdelenia historickej databázy negatívnych kontrol laboratória. Ak údaje zo súbežných negatívnych kontrol nespadajú do 95 % regulačných medzí, môžu byť prijateľné na zaradenie do rozdelenia historických kontrol, pokiaľ tieto údaje nie sú extrémne odľahlými hodnotami a pokiaľ existujú dôkazy, že testovací systém je „pod kontrolou“ (pozri bod 11) a neexistujú žiadne dôkazy o technickom alebo ľudskom zlyhaní.

OPIS METÓDY

Príprava

Výber živočíšnych druhov

Mali by sa vyberať bežne používané laboratórne kmene zdravých mladých dospelých zvierat. Bežne sa používajú potkany, hoci vhodné môžu byť aj myši. Použiť možno akékoľvek iné vhodné druhy cicavcov, ak je to vedecky zdôvodnené v správe.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia zvierat

V prípade hlodavcov by mala byť teplota v miestnosti pre zvieratá 22 °C (± 3 °C). Hoci ideálna relatívna vlhkosť by mala byť 50 – 60 %, mala by dosahovať minimálne 40 % a podľa možnosti by nemala presiahnuť 70 % okrem času čistenia miestnosti. Osvetlenie by malo byť umelé so striedaním 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie možno používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzeným prísunom pitnej vody. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej chemikálie, keď sa podáva týmto spôsobom. Hlodavce by mali byť umiestnené do malých skupín (najviac päť zvierat na jednu klietku) rovnakého pohlavia a testovanej skupiny, pokiaľ sa nepredpokladá žiadne agresívne správanie, pričom sa uprednostňujú klietky s pevnou podlahou a vhodne obohateným prostredím. Zvieratá môžu byť umiestnené samostatne len vtedy, ak je to vedecky opodstatnené.

Príprava zvierat

Bežne sa používajú zdravé mladé dospelé zvieratá (pri hlodavcoch je ideálny vek 6 – 10 týždňov na začiatku testovania, hoci je prijateľný aj trochu vyšší vek), ktoré sa náhodne rozdelia do kontrolných a testovaných skupín. Každé zviera sa jedinečne označí humánnou, minimálne invazívnou metódou (napr. krúžkovanie, označenie štítkom, aplikácia mikročipu alebo biometrická identifikácia, nie však skracovanie uší ani prstov) a aklimatizuje sa na laboratórne podmienky v priebehu minimálne piatich dní. Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy spôsobené ich umiestnením. Malo by sa zabrániť krížovej kontaminácii pozitívnou kontrolou a testovanou chemikáliou. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variácia zvierat minimálna a nemala by presiahnuť ± 20 % priemernej hmotnosti každého pohlavia.

Príprava dávok

Tuhé testované chemikálie by sa pred podávaním dávok zvieratám mali rozpustiť alebo rozptýliť vo vhodných rozpúšťadlách alebo nosičoch alebo primiešať do krmiva alebo pitnej vody. Kvapalné testované chemikálie sa môžu podávať priamo alebo ich pred podávaním možno rozriediť. V prípade inhalačných expozícií možno testované chemikálie v závislosti od ich fyzikálno-chemických vlastností podávať vo forme plynu, pary alebo aerosólu (tuhá látka/kvapalina). Pokiaľ

▼M7

sa v údajoch o stabilite neuvádza prijateľnosť skladovania a nevymedzujú sa jeho vhodné podmienky, testovaná chemikália by sa mala používať čerstvo pripravená.

Rozpúšťadlo/nosič

Rozpúšťadlo/nosič by nemali vyvolávať toxické účinky pri používaných dávkach a nemalo by sa o nich predpokladať, že budú chemicky reagovať s testovanými chemikáliami. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by mali podporiť referenčné údaje uvádzajúce ich kompatibilitu. Odporúča sa podľa možnosti najskôr zvážiť použitie vodného rozpúšťadla/nosiča. Príklady bežne používaných kompatibilných rozpúšťadiel/nosičov zahŕňajú vodu, fyziologický roztok, roztok metylcelulózy, roztok sodnej soli karboxymetylcelulózy, olivový olej a kukuričný olej. Ak neexistujú historické alebo zverejnené údaje o kontrolách, z ktorých vyplýva, že zvolené atypické rozpúšťadlo/nosič neindukuje tvorbu štruktúrnych chromozómových aberácií ani iné škodlivé účinky, mala by sa vykonať východisková štúdia s cieľom stanoviť prijateľnosť rozpúšťadla/nosiča ako kontroly.

Kontroly

Pozitívne kontroly

Do každého testu by sa za normálnych okolností mala zahrnúť skupina zvierat, ktorej bola podaná chemikália na pozitívnu kontrolu. Možno od toho upustiť v prípade, že testovacie laboratórium preukázalo spôsobilosť pri vykonávaní testu a stanovilo rozsah historických pozitívnych kontrol. Ak nie je zahrnutá súbežná pozitívna kontrolná skupina, do každého experimentu by sa mali zahrnúť kontroly hodnotenia (fixované a nezafarbené preparáty). Možno ich získať tak, že sa do hodnotenia štúdie zahrnú vhodné referenčné vzorky získané a uchované zo samostatného experimentu s pozitívnou kontrolou, ktorý sa vykonáva periodicky (napr. každých 6 až 18 mesiacov) v laboratóriu, kde sa test vykonáva; napríklad počas testovania spôsobilosti a potom pravidelne, podľa potreby.

Chemikálie na pozitívnu kontrolu by mali spoľahlivo vyvolať zistiteľný nárast frekvencie buniek so štruktúrnymi chromozómovými aberáciami nad spontánnu úroveň. Dávky pozitívnej kontroly by sa mali voliť tak, aby boli účinky zjavné, ale aby hodnotiteľovi priamo neodhaľovali identitu kódovaných vzoriek. Je prijateľné, aby sa pozitívne kontroly podávali inou cestou ako testovaná chemikália, na základe iného harmonogramu aplikácie, a aby sa vzorky odoberali len jeden raz. V náležitých prípadoch možno na pozitívnu kontrolu takisto zvážiť použitie chemikálií rovnakej chemickej triedy. Príklady chemikálií na pozitívnu kontrolu sú uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Príklady chemikálií na pozitívnu kontrolu

Chemikália	Číslo CAS
etylmetánsulfonát	62-50-0
metylmetánsulfonát	66-27-3
N-etyl-N-nitrózomočovina	759-73-9
mitomycín C	50-07-7
cyklofosfamid (monohydrát)	50-18-0 (6055-19-2)
tretamín	51-18-3

▼M7

Negatívne kontroly

Zvieratá v negatívnych kontrolných skupinách by mali byť zahrnuté do každého odberu a inak by sa s nimi malo zaobchádzať rovnako ako s testovanými skupinami, nebude im však podaná testovaná chemikália. Ak sa pri podávaní testovanej chemikálie použije rozpúšťadlo/nosič, kontrolná skupina by mala dostať toto rozpúšťadlo/nosič. Ak sa však na základe historických údajov o negatívnych kontrolách pri každom odbere vzoriek v danom testovacom laboratóriu preukážu konzistentné údaje o variabilite medzi zvieratami a o frekvenciách buniek so štruktúrnymi aberáciami, môže byť pre negatívnu kontrolu potrebný len jeden odber. Ak sa na negatívne kontroly použije len jeden odber, mal by to byť odber vykonaný prvý raz v štúdii.

POSTUP

Počet zvierat a ich pohlavie

Vo všeobecnosti je reakcia vo forme vzniku mikrojadier podobná u samcov a samíc (9) a očakáva sa, že to bude platiť aj v prípade štruktúrnych chromozómových aberácií, preto by sa väčšina štúdií mohla uskutočniť na oboch pohlaviach. Údaje, ktoré poukazujú na relevantné rozdiely medzi samcami a samicami (napr. rozdiely v systémovej toxicite, metabolizme, biodostupnosti, toxicite pre kostnú dreň atď. vrátane napr. štúdie na vyhľadávanie rozsahu), by boli v prospech používania oboch pohlaví. V takomto prípade môže byť vhodné vykonať štúdiu na oboch pohlaviach, a to napr. ako súčasť štúdie toxicity po opakovaných dávkach. Ak sa použijú obe pohlavia, mohlo by byť vhodné použiť faktoriálny návrh. Podrobnosti o analýze údajov s použitím tohto návrhu sú uvedené v dodatku 2.

Mala by sa stanoviť veľkosť skupín na začiatku štúdie s cieľom poskytnúť minimálne 5 analyzovateľných zvierat jedného pohlavia alebo, ak sa použijú zvieratá oboch pohlaví, 5 zvierat každého pohlavia za skupinu. V prípade, že expozícia ľudí chemikáliám potenciálne súvisí s pohlavím, ako napríklad v prípade niektorých liekov, daný test by sa mal vykonať na jedincoch príslušného pohlavia. Ako pomôcku pri bežných požiadavkách týkajúcich sa maximálneho počtu zvierat možno uviesť, že štúdia na kostnej dreni s dvomi odbermi vzoriek, tromi dávkovými skupinami a so súbežnými negatívnymi a pozitívnymi kontrolami (každá skupina zložená z piatich zvierat jedného pohlavia) by si vyžadovala 45 zvierat.

Úrovne dávok

Ak sa z dôvodu, že ešte nie sú dostupné vhodné údaje na pomoc pri výbere dávky, vykoná predbežná štúdia na vyhľadávanie rozsahu, mala by sa vykonať v tom istom laboratóriu s použitím toho istého druhu, kmeňa, pohlavia a dávkovacej schémy, aké majú byť použité v hlavnej štúdii (10). Štúdia by sa mala zamerať na zistenie maximálnej tolerovanej dávky (MTD) definovanej ako najvyššia dávka, ktorá sa bude tolerovať bez dôkazu toxicity obmedzujúcej štúdiu, a to vzhľadom na trvanie štúdie (napr. indukovaním zníženia telesnej hmotnosti alebo hematopoetickej systémovej cytotoxicity), ale nie smrti ani znakov bolesti, utrpenia či ťažkostí, ktoré si vyžadujú humánne usmrtenie (11).

Najvyššiu dávku možno takisto definovať ako dávku, ktorá spôsobuje určité známky toxicity v kostnej dreni.

Chemikálie, ktoré vykazujú saturáciu toxikokinetických vlastností alebo indukujú detoxikačné procesy, ktoré môžu viesť k zníženiu expozície po dlhodobom ovplyvňovaní, môžu byť vyňaté z kritérií na stanovenie dávok a mali by sa hodnotiť jednotlivo.

V záujme získania informácií o reakcii na dávku by kompletná štúdia mala zahŕňať negatívnu kontrolnú skupinu a minimálne tri úrovne dávok vo všeobecnosti oddelené faktorom 2, ale nie vyšším ako 4. Ak testovaná chemikália nevyvoláva toxicitu v štúdii na vyhľadávanie rozsahu alebo na základe existujúcich údajov, najvyššia dávka pri jednorazovom podaní by mala byť 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti. Ak však testovaná chemikália spôsobuje toxicitu, maximálna

▼M7

tolerovaná dávka by mala byť najvyššia podávaná dávka a použité úrovne dávky by mali podľa možnosti pokrývať rozsah od maximálnej dávky po dávku, ktorá spôsobuje slabú alebo nespôsobuje žiadnu toxicitu. Ak sa zistí toxicita v cieľovom tkanive (kostná dreň) pri všetkých testovaných úrovniach dávok, odporúča sa vykonať ďalšiu štúdiu s netoxickými dávkami. Štúdie, ktorých cieľom je podrobnejšie charakterizovať kvantitatívne informácie o reakcii na dávku, si môžu vyžadovať ďalšie dávkové skupiny. V prípade určitých druhov testovaných chemikálií (napr. humánne lieky), na ktoré sa vzťahujú osobitné požiadavky, sa tieto limity môžu líšiť.

Limitný test

Ak z pokusov na vyhľadávanie rozsahu dávok alebo existujúcich údajov týkajúcich sa príbuzných kmeňov zvierat vyplýva, že dávkovací režim, aspoň pokiaľ ide o limitujúcu dávku (opísanú ďalej v texte), nespôsobuje žiadne pozorovateľné toxické účinky (vrátane žiadneho poklesu proliferácie kostnej drene alebo iného dôkazu cytotoxicity v cieľovom tkanive), a ak by sa genotoxicita na základe *in vitro* štúdií genotoxicity alebo na základe údajov týkajúcich sa štrukturálne príbuzných chemikálií neočakávala, potom nemusí byť potrebná úplná štúdia s použitím troch úrovní dávok, ak sa preukázalo, že testovaná chemikália(-e) dosahuje cieľové tkanivo (kostná dreň). V takýchto prípadoch môže byť postačujúca jedna dávka na úrovni limitujúcej dávky. V prípade obdobia podávania chemikálie dlhšieho než 14 dní predstavuje limitujúca dávka 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň. V prípade období podávania chemikálie počas najviac 14 dní predstavuje limitujúca dávka 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň.

Podávanie dávok

Pri plánovaní skúšky by sa mal zvážiť predpokladaný spôsob expozície ľudí. Preto možno ako opodstatnené zvoliť spôsoby expozície prostredníctvom stravy, pitnej vody, topickou, subkutánnou cestou, intravenózne, perorálne (pomocou sondy), inhalačne, intratracheálne alebo implantačne. V každom prípade by sa mal zvoliť spôsob, ktorým sa zabezpečí primeraná expozícia cieľového tkaniva(-ív). Vo všeobecnosti sa neodporúča použitie intraperitoneálnej injekcie, keďže to nie je zamýšľaný spôsob expozície ľudí, a mal by sa použiť iba s osobitným vedeckým zdôvodnením. Ak je testovaná chemikália primiešaná do krmiva alebo pitnej vody, najmä v prípade jednej dávky, treba venovať pozornosť tomu, aby sa medzi spotrebou potravy a vody a odberom vzorky ponechal dostatočný čas na zistenie účinkov (pozri body 33 – 34). Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže naraz podávať sondou alebo injekciou, závisí od veľkosti testovaného zvieraťa. Objem by za bežných okolností nemal prekročiť 1 ml/100 g telesnej hmotnosti okrem vodných roztokov, pri ktorých možno použiť najviac 2 ml/100 g. Požitie väčších ako uvedených objemov by malo byť opodstatnené. S výnimkou dráždivých alebo žieravých testovaných chemikálií, ktoré pri vyšších koncentráciách zvyčajne vyvolajú zhoršenie účinkov, by sa variabilita v objeme testovanej chemikálie mala minimalizovať tým, že sa koncentrácia upraví tak, aby sa na všetkých úrovniach dávok zabezpečil stály objem vo vzťahu k telesnej hmotnosti.

Harmonogram aplikácie

Testované chemikálie sa bežne podávajú jednorazovou aplikáciou, ale možno ich podať v delenej dávke (t. j. dve alebo viaceré aplikácie v jeden deň s časovým odstupom najviac 2 – 3 hodiny), čím sa uľahčí podávanie veľkého objemu chemikálie. Za týchto okolností alebo pri podávaní testovanej chemikálie inhalačne by sa mal čas odberu vzoriek naplánovať na základe posledného podania dávky alebo skončenia vystavenia.

V prípade tohto testu existuje len málo dostupných údajov o vhodnosti protokolu opakovanej dávky. V prípadoch, kedy je žiaduce, aby tento test zahŕňal test toxicity po opakovaných dávkach, treba dbať na to, aby sa zabránilo strate mitotických buniek s poškodenými chromozómami, čo sa pri toxických dávkach môže stať. Táto integrácia je prijateľná, ak je najvyššia dávka väčšia alebo sa

▼M7

rovná limitujúcej dávke (pozri bod 29) a dávkovej skupine sa počas trvania testu podáva limitujúca dávka. Ak je žiaduca integrácia s inými štúdiami, v prípade chromozómových aberácií by sa ako preferovaný *in vivo* test mal posúdiť mikrojadrový test (testovacia metóda B.12).

Vzorky kostnej drene by sa mali odoberať v dvoch rôznych časoch po jednej aplikácii testovanej chemikálie. V prípade hlodavcov by prvým intervalom odberu vzorky mal byť čas potrebný na dokončenie 1,5-násobku dĺžky bežného bunkového cyklu (zvyčajne 12 – 18 hodín) po období aplikácie chemikálie. Keďže čas potrebný na príjem a metabolizmus testovanej látky(-ok) a účinky testovanej látky na kinetiku bunkového cyklu môžu ovplyvniť optimálny čas na zistenie chromozómovej aberácie, odporúča sa neskoršie odobratie vzorky – 24 hodín po čase prvého odberu vzorky. V čase prvého odberu by sa mala všetkým dávkovým skupinám aplikovať chemikália a mali by sa odobrať vzorky na analýzu; pri neskoršom odbere(-och) je však potrebné podať len najvyššiu dávku. Ak sa na základe vedeckého zdôvodnenia používajú dávkovacie režimy dlhšie ako jeden deň, všeobecne by sa mal uskutočniť jeden odber vzorky pri približne 1,5-násobku dĺžky bežného bunkového cyklu po poslednej aplikácii chemikálie.

Po ošetrení a pred odberom vzoriek sa zvieratám intraperitoneálne vstrekne vhodná dávka prostriedku zastavujúceho metafázu (napr. kolcemid alebo kolchicín) a vzorky sa odoberú po uplynutí vhodného času. V prípade myší je tento interval približne 3 – 5 hodín pred odberom a v prípade potkanov 2 – 5 hodín. Bunky sa po odobratí z kostnej drene nechajú napučať, fixujú a farbia sa a analyzujú sa na chromozómové aberácie (12).

Pozorovania

Najmenej raz denne by sa mali vykonať všeobecné klinické pozorovania testovaných zvierat a zaznamenať klinické príznaky, najlepšie každý deň v rovnakom čase a s ohľadom na časový interval najintenzívnejších predpokladaných účinkov po podaní dávky. Počas obdobia podávania dávok by sa mala aspoň dvakrát denne sledovať chorobnosť a úmrtnosť zvierat. Všetky zvieratá by sa mali odvážiť na začiatku štúdie, a to aspoň raz za týždeň počas štúdií s opakovanou dávkou, a potom pri usmrtení. V prípade štúdií, ktoré trvajú aspoň jeden týždeň, by sa malo aspoň raz za týždeň vykonať meranie spotreby potravy. Ak sa testovaná chemikália podáva v pitnej vode, spotreba vody by sa mala merať pri každej výmene vody a aspoň raz za týždeň. Zvieratá, ktoré vykazujú neletálne ukazovatele nadmernej toxicity, by mali byť humánne usmrtené pred ukončením testovacieho obdobia (11).

Expozícia cieľového tkaniva

Vzorka krvi by sa mala odobrať vo vhodnom čase(-och), aby bolo možné preskúmať úrovne testovaných chemikálií v plazme na účely preukázania, že došlo k expozícii kostnej drene, ak je to opodstatnené a ak neexistujú iné údaje o expozícii (pozri bod 45).

Príprava kostnej drene a chromozómov

Ihneď po humánnom usmrtení sa zo stehenných alebo holenných kostí zvierat odoberú bunky kostnej drene, ktoré sa vystavia pôsobeniu hypotonického roztoku a následne sa fixujú. Bunky v metafáze sa potom rozotrú na sklíčka a zafarbia sa bežnými metódami pozri [(3) (12)].

▼M7

Analýza

Všetky preparáty vrátane pozitívnych a negatívnych kontrol by sa mali pred analýzou nezávisle označiť kódmi a mali by sa náhodne usporiadať, aby hodnotiaci nebol oboznámený s podmienkami testovania.

Ako meradlo cytotoxicity by sa mal stanoviť mitotický index, a to aspoň na 1 000 bunkách na jedno zviera v prípade všetkých ovplyvňovaných zvierat (vrátane pozitívnych kontrol), neovplyvňovaných alebo negatívnych kontrolných zvierat s nosičom/rozpúšťadlom.

V prípade každého zvieraťa by sa malo analyzovať aspoň 200 metafáz na štruktúrne chromozómové aberácie vrátane gapov a bez gapov (6). Ak historická databáza negatívnych kontrol naznačuje, že v testovacom laboratóriu je priemerná hodnota frekvencie štruktúrnych chromozómových aberácií v pozadí < 1 %, malo by sa zvážiť hodnotenie ďalších buniek. Aberácie chromatidového a chromozómového typu by sa mali zaznamenávať oddelene a klasifikovať podľa podtypov (zlomy, výmeny). Postupy používané v laboratóriu by mali zabezpečiť, aby analýzy chromozómových aberácií vykonávali dobre vyškolení hodnotiaci pracovníci a aby sa podľa potreby partnersky preskúmali. Vzhľadom na to, že pri príprave preparátov často dochádza k zlomom časti buniek v metafáze s následnou stratou chromozómov, vyhodnocované bunky by preto mali obsahovať najmenej $2n \pm 2$ centromér, kde n je haploidný počet chromozómov pre daný druh.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Spracovanie výsledkov

Údaje o jednotlivých zvieratách by sa mali uvádzať v tabuľkovej forme. V prípade každého zvieraťa by sa mal vyhodnotiť mitotický index, počet hodnotených buniek v metafáze, počet aberácií na bunku v metafáze a percentuálny podiel buniek so štruktúrnou chromozómovou aberáciou, resp. aberáciami. V prípade ovplyvňovaných a kontrolných skupín by sa mali uvádzať rôzne typy štruktúrnych chromozómových aberácií s príslušnými počtami a frekvenciami. Gapy, polyploidné bunky a bunky s endoreduplikovanými chromozómami sa zaznamenávajú oddelene. Frekvencia gapov sa zaznamenáva, ale vo všeobecnosti sa nezahŕňa do analýzy celkovej frekvencie štruktúrnych aberácií. Ak neexistujú dôkazy o rozdieloch medzi reakciami rôznych pohlaví, údaje možno na účely štatistickej analýzy kombinovať. Mali by sa uvádzať aj údaje o toxicite a klinických príznakoch u zvierat.

Kritériá prijateľnosti

Prijateľnosť testu určujú tieto kritériá:

a) Údaje o súbežných negatívnych kontrolách sa pokladajú za prijateľné na to, aby sa doplnili do historickej databázy kontrol (pozri body 11 – 14).

b) Súbežné pozitívne kontroly alebo kontroly hodnotenia by mali vyvolať reakcie, ktoré sú zlučiteľné s reakciami generovanými v historickej databáze pozitívnych kontrol a viesť k štatisticky významnému nárastu v porovnaní s negatívnou kontrolou (pozri body 20 – 21).

c) Vykonala sa analýza primeraného počtu dávok a buniek.

d) Kritériá výberu najvyššej dávky sú v súlade s kritériami opísanými v bodoch 25 – 28.

Vyhodnotenie a interpretácia výsledkov

Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, testovaná chemikália sa pokladá za jasne pozitívnu, ak:

▼M7

a) aspoň jedna z testovaných skupín vykazuje štatisticky významné zvýšenie frekvencie buniek so štruktúrnymi chromozómovými aberáciami (bez gapov) v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

b) toto zvýšenie súvisí s dávkou aspoň pri jednom odbere vzorky, keď sa posúdenie vykonáva vhodným testom trendov, a

c) niektorý z týchto výsledkov je mimo rozdelenia historických údajov týkajúcich sa negatívnych kontrol (napr. mimo 95 % regulačných medzí Poissonovho rozdelenia).

Ak sa v konkrétnom čase odberu vzorky preskúma len najvyššia dávka, testovaná chemikália sa pokladá za jasne pozitívnu, ak dôjde k štatisticky významnému zvýšeniu v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou a výsledky sú mimo rozdelenia historických údajov týkajúcich sa negatívnych kontrol (napr. mimo 95 % regulačných medzí Poissonovho rozdelenia). Odporúčania týkajúce sa vhodných štatistických metód možno nájsť v literatúre (13). Pri vykonávaní analýzy vzťahu medzi dávkou a reakciou by sa mali analyzovať aspoň tri ovplyvňované dávkové skupiny. Pri štatistických testoch by sa malo použiť zviera ako experimentálna jednotka. Pozitívne výsledky testu na chromozómové aberácie naznačujú, že testovaná chemikália indukuje štruktúrne chromozómové aberácie v bunkách kostnej drene testovaného druhu.

Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, sa testovaná chemikália pokladá za jasne negatívnu, ak pri všetkých preskúmaných experimentálnych podmienkach platí, že:

a) žiadna z testovaných skupín nevykazuje štatisticky významné zvýšenie frekvencie buniek so štruktúrnymi chromozómovými aberáciami (bez gapov) v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

b) počas žiadneho odberu vzorky nedochádza k zvýšeniu závislému od dávky, ak sa vykoná posúdenie pomocou vhodného testu trendu,

c) všetky výsledky sa vyskytujú v rámci rozloženia historických údajov týkajúcich sa negatívnych kontrol (napr. v 95 % regulačných medziach Poissonovho rozdelenia) a

d) došlo k expozícii kostnej drene testovanej chemikálii(-ám).

Odporúčania týkajúce sa najvhodnejších štatistických metód možno nájsť v literatúre (13). Ako dôkaz o expozícii kostnej drene testovanej chemikálii môže slúžiť zníženie mitotického indexu alebo meranie hladín testovanej chemikálie resp. chemikálií v plazme alebo krvi. V prípade intravenózneho podania nie je potrebný dôkaz o expozícii. Alternatívne možno na preukázanie expozície kostnej drene použiť údaje ADME získané v nezávislej štúdii s použitím toho istého spôsobu podania a toho istého druhu. Negatívne výsledky naznačujú, že za daných testovacích podmienok testovaná chemikália neindukuje štruktúrne chromozómové aberácie v bunkách kostnej drene testovaného druhu.

Overenie jasnej pozitívnej alebo negatívnej reakcie sa nevyžaduje.

V prípade, že reakcia nie je jednoznačne negatívna alebo pozitívna, a v prípade, že ide o pomoc pri stanovovaní biologickej relevantnosti výsledku (napr. slabé alebo hraničné zvýšenie), by sa údaje mali odborne posúdiť a/alebo by sa existujúce vykonané pokusy mali podrobiť ďalšiemu skúmaniu. V niektorých prípadoch by mohlo byť užitočné vykonať analýzu viacerých buniek alebo zopakovať experiment za upravených experimentálnych podmienok.

▼M7

V zriedkavých prípadoch, dokonca ani po ďalších skúmaniach, z údajov nemožno vyvodiť záver, že testovaná chemikália vedie k negatívnym alebo pozitívnym výsledkom, a preto sa štúdia uzavrie ako štúdia s nejasným výsledkom.

Frekvencia výskytu polyploidných, ako aj endoreduplikovaných metafáz medzi všetkými metafázami by sa mala zaznamenávať oddelene. Nárast počtu polyploidných/endoreduplikovaných buniek môže naznačovať, že testovaná chemikália má potenciál brzdiť mitotické procesy alebo postup bunkového cyklu (pozri bod 3).

Skúšobný protokol

Skúšobný protokol by mal zahŕňať tieto informácie:

Zhrnutie

Testovaná chemikália:

— zdroj, číslo šarže, konečný dátum použitia, ak sú tieto informácie k dispozícii,

— stabilita testovanej chemikálie, ak je známa.

Jednozložková látka:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— chemická identifikácia ako názov IUPAC alebo názov CAS, CAS číslo, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt podľa vhodnosti a praktickej realizovateľnosti atď.

Viaczložková látka, UVCB a zmesi:

— čo najviac charakterizované chemickou identitou (pozri vyššie), kvantitatívnym výskytom a príslušnými fyzikálno-chemickými vlastnosťami zložiek.

Príprava testovanej chemikálie:

— zdôvodnenie výberu nosiča,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa,

— príprava krmiva, pitnej vody alebo inhalačných prípravkov,

— analytické stanovenie prípravkov (napr. stabilita, homogenita, nominálne koncentrácie), ak bolo vykonané.

Testované zvieratá:

— použitý druh/kmeň a zdôvodnenie použitia,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.,

— metóda jedinečnej identifikácie zvierat,

— v prípade krátkodobých štúdií: hmotnosť jednotlivých zvierat na začiatku a na konci testu, v prípade štúdií dlhších ako jeden týždeň: hmotnosť jednotlivých zvierat počas štúdie a konzumácie potravy. V prípade každej skupiny by sa mal uviesť aj rozsah telesnej hmotnosti, priemer a štandardná odchýlka.

▼M7

Podmienky testu:

— pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo/nosič) kontroly,

— údaje zo štúdie na vyhľadávanie rozsahu, ak sa vykonala,

— odôvodnenie výberu veľkosti dávky,

— podrobné údaje o príprave testovanej chemikálie,

— podrobné údaje o podávaní testovanej chemikálie,

— zdôvodnenie cesty a trvania podávania,

— metódy overovania, že testovaná chemikália resp. chemikálie dosiahli veľký krvný obeh alebo kostnú dreň,

— skutočná dávka (mg/kg telesnej hmotnosti/deň) vypočítaná z koncentrácie testovanej chemikálie (ppm) v krmive/pitnej vode a zo spotreby krmiva/pitnej vody, ak sa uplatňuje,

— podrobné údaje o kvalite potravy a vody,

— spôsob usmrtenia,

— metóda analgézie (v prípade použitia),

— podrobný opis harmonogramu aplikácie chemikálie a odberu vzoriek a zdôvodnenie volieb,

— metódy prípravy preparátov,

— metódy merania toxicity,

— identita chemikálie zastavujúcej metafázu, jej koncentrácia, dávka a čas podania pred odberom vzoriek,

— postupy izolácie a uchovávania vzoriek,

— kritériá pre hodnotenie aberácií,

— počet analyzovaných buniek v metafáze na jedno zviera a počet analyzovaných buniek na určenie mitotického indexu,

— kritériá prijateľnosti štúdie,

— kritériá pre považovanie štúdií za pozitívne, negatívne alebo nejednoznačné.

Výsledky:

— stav zvieraťa pred testovaním a počas obdobia testovania vrátane príznakov toxicity,

— mitotický index uvedený oddelene pre každé zviera,

— typ a počet aberácií a buniek s aberáciami uvedený oddelene pre každé zviera,

— celkový počet aberácií na skupinu s priemerom a štandardnou odchýlkou,

— počet buniek s aberáciami na skupinu s priemerom a štandardnou odchýlkou,

— zmeny v ploídii, ak sa pozorovali, vrátane frekvencie polyploidných a/alebo endoreduplikovaných buniek,

▼**M7**

— vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je možné ho určiť,

— použité štatistické analýzy a štatistická metóda,

— údaje na podporu výskytu expozície kostnej drene,

— údaje o súbežných negatívnych a pozitívnych kontrolách s rozsahmi, priemermi a štandardnými odchýlkami,

— historické údaje týkajúce sa pozitívnych a negatívnych kontrol, ich rozsahy, priemery, štandardné odchýlky a 95 % regulačné medze rozdelenia, ako aj príslušné časové obdobie a počet pozorovaní,

— splnené kritériá pre pozitívne alebo negatívne reakcie.

Výsledky a diskusia

Záver

Odkazy

LITERATÚRA

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^{o} 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

Dodatok 1

DEFINÍCIE

Aneuploidia: akákoľvek odchýlka od bežného diploidného (alebo haploidného) počtu chromozómov vo forme jedného alebo viacerých chromozómov, nie však vo forme viacnásobkov celého(-ých) súboru(-ov) chromozómov (pozri polyploidia).

Centroméra: oblasť(-ti) chromozómu, v ktorej(-ých) sa vlákna deliaceho vretienka pripájajú k chromozómu počas delenia bunky a ktorá(-é) umožňuje(-ú) riadny pohyb dcérskych chromozómov k pólom dcérskych buniek.

Chemikália: látka alebo zmes.

Aberácia chromatidového typu: štruktúrne chromozómové poškodenie prejavujúce sa ako zlom jednej z chromatíd alebo zlom a opätovné spojenie medzi chromatídami.

Aberácia chromozómového typu: štruktúrne chromozómové poškodenie prejavujúce sa ako zlom alebo zlom a opätovné spojenie oboch chromatíd na rovnakej strane.

Endoreduplikácia: proces, v ktorom po S fáze replikácie DNA jadro neprechádza do mitózy, ale začína ďalšiu S fázu. Výsledkom sú chromozómy so 4, 8, 16... chromatídami.

Gap: achromatická lézia menšia ako šírka jednej chromatídy s minimálnym posunutím chromatíd.

Mitotický index: pomer medzi počtom buniek v mitóze a celkovým počtom buniek v populácii, ktorý je meradlom stavu proliferácie tejto bunkovej populácie.

Numerická aberácia: zmena v počte chromozómov v porovnaní s bežným počtom charakteristickým pre použité zvieratá (aneuploidia).

Polyploidia: numerická chromozómová aberácia, ktorá zahŕňa zmenu počtu celých súborov chromozómov, na rozdiel od numerickej zmeny v časti súboru chromozómov (pozri aneuploidia).

Štruktúrna chromozómová aberácia: zmena v chromozómovej štruktúre rozpoznateľná mikroskopickým skúmaním metafázového štádia delenia buniek, pozorovaná ako delécie a fragmenty, intrachromozomálne výmeny alebo interchromozomálne výmeny.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

▼M7

Dodatok 2

FAKTORIÁLNY NÁVRH NA IDENTIFIKÁCIU ROZDIELOV MEDZI POHLAVIAMI V *IN VIVO* SKÚŠKE NA CHROMOZÓMOVÚ ABERÁCIU

Faktoriálny návrh a jeho analýza

Na základe tohto návrhu sa testuje minimálne 5 samcov a 5 samíc pri každej úrovni koncentrácie, čo vedie k návrhu s použitím minimálne 40 zvierat (20 samčekov a 20 samičiek, plus príslušné pozitívne kontroly).

Uvedený návrh, ktorý predstavuje jeden z jednoduchších faktoriálnych návrhov, je ekvivalentný s dvojfaktorovou analýzou rozptylu, pričom pohlavie a úroveň koncentrácie sú hlavnými účinkami. Údaje možno analyzovať použitím mnohých štandardných softvérových balíkov pre štatistiku, ako sú napr. SPSS, SAS, STATA, Genstat, ako aj pomocou „R“.

Pomocou analýzy sa variabilita v súbore údajov rozdelí na variabilitu medzi pohlaviami, variabilitu medzi koncentráciami a variabilitu v súvislosti s interakciou medzi pohlaviami a koncentráciami. Každá z podmienok sa testuje voči odhadu variability medzi paralelnými zvieratami v rámci skupín zvierat rovnakého pohlavia pri rovnakej koncentrácii. Podrobné informácie o použitej metodike sú dostupné v mnohých štandardných štatistických príručkách (pozri odkazy) a v rámci podpory poskytnutej v balíkoch pre štatistiku.

Analýza prebieha formou preskúmania podmienky interakcie medzi pohlavím a koncentráciou v tabuľke ANOVA ([1]). Ak nenastane výrazná interakcia kombinovaných hodnôt (obe pohlavia a rôzne koncentrácie testovanej látky), platné štatistické testy ANOVA poskytnú informáciu o významnosti rozdielov medzi porovnávanými skupinami a parametrami na základe ich vnútornej variability.

Analýza pokračuje rozdelením odhadovaných hodnôt pre variabilitu medzi koncentráciami na kontrasty, ktoré umožňujú testovanie na lineárne a kvadratické kontrasty reakcií pri všetkých úrovniach koncentrácií. Ak existuje významná interakcia medzi pohlavím a koncentráciou, možno túto podmienku rozdeliť aj na kontrast interakcie medzi lineárnou hodnotou a pohlavím a kontrast interakcie medzi kvadratickou hodnotou a pohlavím. Tieto podmienky umožňujú testovanie toho, či sú reakcie na koncentráciu u oboch pohlaví rovnaké, alebo či je reakcia každého pohlavia rozdielna.

Na základe odhadov týkajúcich sa združených údajov v rámci skupinovej variability možno vykonať párové testy na zistenie rozdielu medzi priemernými hodnotami. Tieto porovnania by sa mohli vykonať medzi priemernými hodnotami pre obe pohlavia a medzi priemernými hodnotami pre rôzne úrovne koncentrácie, ako sú napríklad porovnania s úrovňami negatívnych kontrol. V prípadoch, keď dochádza k významnej interakcii, možno vykonať porovnania medzi priemernými hodnotami rôznych koncentrácií v rámci jedného pohlavia alebo medzi priemernými hodnotami pohlaví pri rovnakej koncentrácii.

Odkazy

Existuje mnoho štatistických príručiek, v ktorých sa rozoberá teória, návrh, metodika, analýza a výklad faktoriálnych návrhov počnúc najjednoduchšími dvojfaktorovými analýzami po komplexnejšie formy používané v metodike plánovania experimentu. Ide o tento neúplný zoznam. Niektoré knihy poskytujú spracované príklady porovnateľných návrhov, v niektorých prípadoch s kódom na vykonanie analýz pomocou rôznych softvérových balíkov.

([1]) Štatistici, ktorí si zvolia vzorový postup, ako napríklad použitie všeobecných lineárnych modelov (General Linear Models, GLM), môžu vykonať analýzu odlišným, no porovnateľným spôsobom, nemusia však nevyhnutne vychádzať z tabuľky ANOVA, ktorá pochádza z obdobia, kedy sa pri výpočte štatistík vypracúvaných v období pred počítačovou érou uplatňovali algoritmické postupy.

▼**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. MIKROJADROVÝ (MIKRONUKLEOVÝ) TEST NA ERYTROCYTOCH CICAVCOV

ÚVOD

Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov 474 (2016). Je súčasťou série testovacích metód v oblasti genetickej toxikológie. Bol vypracovaný dokument OECD, ktorý obsahuje stručné informácie o testovaní v oblasti genetickej toxikológie a prehľad posledných zmien, ktoré sa vykonali v týchto usmerneniach na vykonávanie testov (1).

Tento *in vivo* mikrojadrový test na cicavcoch je osobitne relevantný pre hodnotenie genotoxicity, pretože faktory *in vivo* metabolizmu, farmakokinetiky a opravných procesov DNA sú aktívne a prispievajú k reakciám, hoci sú v prípade rôznych druhov odlišné. *In vivo* skúška je takisto užitočná pre ďalšie skúmanie genotoxicity zistenej pomocou *in vitro* systému.

In vivo mikrojadrový test na cicavcoch sa používa na zisťovanie poškodenia vyvolaného testovanou chemikáliou na chromozómoch alebo mitotickom aparáte erytroblastov. Testom sa hodnotí tvorba mikrojadier v erytrocytoch odobratých buď z kostnej drene alebo z periférnych krvných buniek zvierat, zvyčajne hlodavcov.

Účelom mikrojadrového testu je identifikovať chemikálie spôsobujúce cytogenetické poškodenie, ktorého výsledkom je tvorba mikrojadier obsahujúcich buď oneskorené chromozómové fragmenty alebo celé chromozómy.

Keď sa erytroblast kostnej drene vyvinie na nezrelý erytrocyt (niekedy sa uvádza aj ako polychromatický erytrocyt alebo retikulocyt), hlavné jadro sa vypudzuje; akékoľvek mikrojadro, ktoré sa vytvorilo, môže zostať v cytoplazme. Vizualizácia alebo detekcia mikrojadier je v týchto bunkách jednoduchšia, pretože nemajú hlavné jadro. Zvýšenie frekvencie nezrelých erytrocytov s mikrojadrami u ovplyvnených zvierat je indikáciou vyvolaných štruktúrnych alebo numerických chromozómových aberácií.

Novovytvorené erytrocyty s mikrojadrami sa identifikujú a ich počty sa stanovujú farbením, po ktorom nasleduje buď vizuálne hodnotenie pomocou mikroskopu alebo automatická analýza. Použitie automatizovanej hodnotiacej platformy značne uľahčuje počítanie dostatočného množstva nezrelých erytrocytov v periférnej krvi alebo v kostnej dreni dospelých zvierat. Takéto platformy sú prijateľnými alternatívami manuálneho hodnotenia (2). Porovnávacie štúdie ukázali, že takéto metódy s použitím vhodných kalibračných štandardov môžu priniesť lepšiu vnútrolaboratórnu a medzilaboratórnu reprodukovateľnosť a citlivosť než manuálne mikroskopické hodnotenie (3) (4). Automatizované systémy, ktoré dokážu merať frekvencie erytrocytov s mikrojadrami, zahŕňajú, nie sú však obmedzené na prietokové cytometre (5), platformy obrazovej analýzy (6) (7) a laserové skenovacie cytometre (8).

Hoci to nie je bežnou súčasťou testu, chromozómové fragmenty možno odlíšiť od celých chromozómov na základe niekoľkých kritérií. Tieto kritériá zahŕňajú identifikáciu prítomnosti alebo neprítomnosti kinetochoru alebo centromerickej DNA, ktoré sú charakteristické pre neporušené chromozómy. Neprítomnosť kinetochoru alebo centromerickej DNA naznačuje, že mikrojadro obsahuje len fragmenty chromozómov, zatiaľ čo ich prítomnosť je príznačná pre stratu chromozómov.

Použité definície termínov sú uvedené v dodatku 1.

▼M7

ÚVODNÉ ÚVAHY

Cieľovým tkanivom pre genetické poškodenie v tomto teste je kostná dreň mladých dospelých hlodavcov, keďže erytrocyty sa tvoria v tomto tkanive. Meranie mikrojadier v nezrelých erytrocytoch v periférnej krvi je prijateľné aj u iných druhov cicavcov, v prípade ktorých bola preukázaná primeraná citlivosť na detekciu chemikálií spôsobujúcich štruktúrne alebo numerické chromozómové aberácie v týchto bunkách (indukciou vzniku mikrojadier v nezrelých erytrocytoch) a v prípade ktorých je poskytnuté vedecké zdôvodnenie. Hlavným sledovaným parametrom je frekvencia nezrelých erytrocytov s mikrojadrami. Frekvenciu zrelých erytrocytov obsahujúcich mikrojadrá v periférnej krvi možno takisto použiť ako sledovaný parameter pri druhoch bez silného vychytávania buniek s mikrojadrami v slezine a v prípade, že sú zvieratá ovplyvňované nepretržite počas obdobia, ktoré presahuje životnosť erytrocytov u použitých druhov (napr. 4 alebo viac týždňov v prípade myší).

Ak existujú dôkazy, že testovaná(-é) chemikália(-e) alebo jej/ich metabolit(-y) nedosiahne(-u) cieľové tkanivo, nemusí byť vhodné použiť tento test.

Pred použitím testovacej metódy v prípade zmesi s cieľom generovať údaje pre stanovený regulačný účel by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť primerané výsledky na tento účel, a ak môže, malo by sa to zdôvodniť. Takéto úvahy nie sú potrebné, ak existuje regulačná požiadavka na testovanie zmesi.

PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Zvieratá sú vystavené testovanej chemikálii vhodným spôsobom. Ak sa používa kostná dreň, zvieratá sa vo vhodnom(-ých) čase(-och) po ovplyvnení humánnym spôsobom utratia, odoberie sa kostná dreň a pripravia a zafarbia sa preparáty (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15)sa. Ak sa používa periférna krv, odoberá sa vo vhodnom(-ých) čase(-och) po ovplyvnení a pripravia a zafarbia sa preparáty (12) (16) (17) (18). Ak sa ovplyvnenie vykoná akútne, je dôležité zvoliť časy odberu kostnej drene alebo krvi, kedy možno zistiť indukciu nezrelých erytrocytov s mikrojadrami súvisiacu s ovplyvnením. V prípade odberu periférnej krvi musí takisto ubehnúť dostatočný čas na to, aby sa tieto javy objavili v krvnom obehu. Preparáty sa analyzujú na prítomnosť mikrojadier buď vizualizáciou pod mikroskopom, obrazovou analýzou, prietokovou cytometriou alebo laserovou skenovacou cytometriou.

OVEROVANIE SPÔSOBILOSTI LABORATÓRIA

Zisťovanie spôsobilosti

S cieľom potvrdiť dostatočné skúsenosti s vykonávaním skúšky pred jej použitím na rutinné testovanie by laboratórium malo preukázať schopnosť reprodukovať predpokladané výsledky zo zverejnených údajov (17) (19) (20) (21) (22), pokiaľ ide o frekvenciu výskytu mikrojadier, s minimálne dvoma chemikáliami na pozitívnu kontrolu (vrátane slabých reakcií vyvolaných nízkymi dávkami pozitívnych kontrol), ako sú chemikálie uvedené v tabuľke 1, a s kompatibilnými kontrolami nosiča/rozpúšťadla (pozri bod 26). Pri týchto pokusoch by sa mali používať dávky, ktoré vyvolajú reprodukovateľný a od dávky závislý nárast účinku a preukážu citlivosť a dynamický rozsah testovacieho systému v predmetnom tkanive (kostná dreň alebo periférna krv), pričom sa použije metóda hodnotenia, ktorá sa má uplatňovať v laboratóriu. Táto požiadavka sa nevzťahuje na laboratóriá, ktoré majú skúsenosti, t. j. majú dostupnú historickú databázu, ako sa vymedzuje v bodoch 14 – 18.

Údaje o historických kontrolách

V priebehu zisťovania spôsobilosti by malo laboratórium určiť:

— rozsah a rozdelenie historických pozitívnych kontrol a

▼M7

— rozsah a rozdelenie historických negatívnych kontrol.

Pri prvom získavaní údajov súvisiacich s rozdelením historických negatívnych kontrol by súbežné negatívne kontroly mali byť v súlade s uverejnenými údajmi o kontrolách, ak takéto údaje existujú. S pridávaním ďalších údajov k rozdeleniu historických kontrol by súbežné negatívne kontroly mali byť v ideálnom prípade v rámci 95 % regulačných medzí tohto rozdelenia. Databáza historických negatívnych kontrol laboratória by mala byť štatisticky solídna, aby sa laboratóriu zabezpečila možnosť posudzovať rozdelenie svojich údajov o negatívnych kontrolách. Na základe literatúry môže byť potrebných minimálne 10 pokusov, no bolo by vhodnejšie vykonať aspoň 20 pokusov za porovnateľných podmienok. Laboratóriá by mali použiť metódy kontroly kvality, ako sú regulačné diagramy [napr. tzv. „C-charts“ alebo „X-bar charts“ (23)], s cieľom zistiť variabilitu svojich údajov a preukázať, že metodika je v laboratóriu „pod kontrolou“. Ďalšie odporúčania ako vytvárať a využívať historické údaje (t. j. kritériá zaradenia údajov medzi historické údaje a ich vylúčenia z historických údajov a kritériá prijateľnosti v prípade daného pokusu) možno nájsť v literatúre (24).

Ak laboratórium nevykoná dostatočný počet pokusov na vytvorenie štatisticky solídneho rozdelenia negatívnych kontrol (pozri bod 15) počas zisťovania spôsobilosti (ako sa opisuje v bode 13), je prijateľné, aby sa rozdelenie mohlo vytvárať počas prvých rutinných testov. Tento postup by mal vychádzať z odporúčaní uvedených v literatúre (24) a výsledky negatívnych kontrol získané na základe týchto pokusov by mali zostať v súlade s uverejnenými údajmi o negatívnych kontrolách.

Všetky zmeny v experimentálnom protokole by sa mali posúdiť z hľadiska ich vplyvu na výsledné údaje, ktoré musia zostať v súlade so súčasnou databázou historických kontrol v laboratóriu. K vytvoreniu novej databázy historických kontrol by mali viesť len veľké rozdiely, ak sa na základe odborného posúdenia zistí, že sa líši od predchádzajúceho rozdelenia (pozri bod 15). Počas tejto obnovy nemusí byť potrebná úplná databáza negatívnych kontrol na vykonanie príslušného testu, ak vie laboratórium preukázať, že jeho hodnoty súbežných negatívnych kontrol sú naďalej v súlade s jeho predchádzajúcou databázou alebo s príslušnými uverejnenými údajmi.

Údaje o negatívnych kontrolách by mali zahŕňať údaje o výskyte nezrelých erytrocytov s mikrojadrami v každom zvierati. Súbežné negatívne kontroly by v ideálnom prípade mali byť v rámci 95 % regulačných medzí rozdelenia databázy historických negatívnych kontrol laboratória. Ak údaje o súbežných negatívnych kontrolách nespadajú do 95 % regulačných medzí, môžu byť prijateľné na zaradenie do rozdelenia historických kontrol, pokiaľ tieto údaje nie sú extrémne mimo uvedených medzí a pokiaľ existujú dôkazy, že testovací systém je „pod kontrolou“ (pozri bod 15) a neexistujú žiadne dôkazy o technickom alebo ľudskom zlyhaní.

OPIS METÓDY

Príprava

Výber živočíšnych druhov

Mali by sa vyberať bežne používané laboratórne kmene zdravých mladých dospelých zvierat. Použiť možno myši, potkany alebo iné vhodné druhy cicavcov. Ak sa používa periférna krv, musí byť preukázané, že odstránenie buniek s mikrojadrami z krvného obehu uskutočnené v slezine neovplyvní detekciu

▼M7

indukovaných mikrojadier vo vybraných druhoch. Toto bolo jasne preukázané v prípade periférnej krvi myší a potkanov (2). V správe by malo byť poskytnuté vedecké zdôvodnenie použitia iných druhov než potkanov a myší. Ak sa použijú iné druhy než hlodavce, odporúča sa, aby sa meranie indukovaných mikrojadier začlenilo do iného vhodného testu toxicity.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia zvierat

V prípade hlodavcov by mala byť teplota v miestnosti pre zvieratá 22 °C (± 3 °C). Hoci ideálna relatívna vlhkosť by mala byť 50 – 60 %, mala by dosahovať minimálne 40 % a podľa možnosti by nemala presiahnuť 70 % inokedy než počas čistenia miestnosti. Osvetlenie by malo byť umelé so striedaním 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzeným prísunom pitnej vody. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej chemikálie, keď sa podáva týmto spôsobom. Hlodavce by mali byť umiestnené do malých skupín (najviac päť zvierat na jednu klietku) rovnakého pohlavia a ovplyvnenej skupiny, pokiaľ sa nepredpokladá žiadne agresívne správanie, pričom sa uprednostňujú klietky s pevnou podlahou a vhodne obohateným prostredím. Zvieratá môžu byť umiestnené samostatne len vtedy, ak je to vedecky opodstatnené.

Príprava zvierat

Bežne sa používajú zdravé mladé dospelé zvieratá (pri hlodavcoch je ideálny vek 6 – 10 týždňov na začiatku ovplyvňovania, hoci je prijateľný aj trochu vyšší vek), ktoré sa náhodne rozdelia do kontrolných a ovplyvnených skupín. Každé zviera sa jednotlivo označí humánnou, minimálne invazívnou metódou (napr. krúžkovanie, označenie štítkom, aplikácia mikročipu alebo biometrická identifikácia, nie však skracovanie uší ani prstov) a aklimatizuje sa na laboratórne podmienky v priebehu minimálne piatich dní. Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy spôsobené ich umiestnením. Malo by sa zabrániť krížovej kontaminácii pozitívnou kontrolou a testovanou chemikáliou. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variabilita zvierat minimálna a nemala by presiahnuť ± 20 % priemernej hmotnosti každého pohlavia.

Príprava dávok

Tuhé testované chemikálie by sa pred podávaním dávok zvieratám mali rozpustiť alebo rozptýliť vo vhodných rozpúšťadlách alebo nosičoch alebo primiešať do krmiva alebo pitnej vody. Kvapalné testované chemikálie sa môžu podávať priamo alebo ich pred podávaním možno rozriediť. V prípade inhalačných expozícií možno testované chemikálie v závislosti od ich fyzikálno-chemických vlastností podávať vo forme plynu, pary alebo aerosólu (tuhá látka/kvapalina). Pokiaľ sa v údajoch o stabilite neuvádza prijateľnosť skladovania a nevymedzujú sa jeho vhodné podmienky, testovaná chemikália by sa mala používať čerstvo pripravená.

Podmienky testu

Rozpúšťadlo/nosič

Rozpúšťadlo/nosič by nemali vyvolávať toxické účinky pri používaných dávkach a nemali by mať schopnosť chemicky reagovať s testovanou chemikáliou. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by mali podporiť referenčné údaje uvádzajúce ich kompatibilitu. Odporúča sa podľa možnosti najskôr zvážiť použitie vodného rozpúšťadla/nosiča. Príklady bežne používaných kompatibilných rozpúšťadiel/nosičov zahŕňajú vodu, fyziologický roztok, roztok metylcelulózy, roztok sodnej soli karboxymetylcelulózy, olivový olej a kukuričný olej. Ak neexistujú historické alebo zverejnené údaje o kontrolách, z ktorých vyplýva, že zvolené atypické rozpúšťadlo/nosič neindukuje tvorbu mikrojadier ani iné škodlivé účinky, mala by sa vykonať východisková štúdia s cieľom stanoviť prijateľnosť kontroly rozpúšťadla/nosiča.

▼M7

Kontroly

Pozitívne kontroly

Do každého testu by sa za normálnych okolností mala zahrnúť skupina zvierat ovplyvnená chemikáliou na pozitívnu kontrolu. Možno od toho upustiť v prípade, že skúšobné laboratórium preukázalo spôsobilosť pri vykonávaní testu a stanovilo rozsah historických pozitívnych kontrol. Ak nie je zahrnutá súbežná pozitívna kontrolná skupina, do každého pokusu by sa mali zahrnúť kontroly hodnotenia (fixované a nezafarbené podložné sklíčka alebo vzorky bunkovej suspenzie, podľa toho, čo je pre danú metódu hodnotenia vhodné). Možno ich získať tak, že sa do hodnotenia štúdie zahrnú vhodné referenčné vzorky získané a uchované zo samostatného pokusu s pozitívnou kontrolou, ktorý sa vykonáva periodicky (napr. každých 6 až 18 mesiacov); napríklad počas testovania spôsobilosti a potom pravidelne, podľa potreby.

Chemikálie na pozitívnu kontrolu by mali spoľahlivo vyvolať zistiteľný nárast frekvencie mikrojadier nad spontánnu úroveň. Pri manuálnom hodnotení pomocou mikroskopu by sa dávky pozitívnej kontroly mali zvoliť tak, aby boli účinky zjavné, ale aby hodnotiteľovi priamo neodhaľovali identitu kódovaných vzoriek. Je prijateľné, aby sa pozitívne kontroly podávali inou cestou ako testovaná chemikália, na základe iného harmonogramu ovplyvňovania a aby sa vzorky odoberali len jeden raz. V náležitých prípadoch možno na pozitívnu kontrolu takisto zvážiť použitie chemikálií rovnakej chemickej triedy. Príklady chemikálií na pozitívnu kontrolu sú uvedené v tabuľke 1

Tabuľka 1

Príklady chemikálií na pozitívnu kontrolu:

Chemikálie a CAS čísla
etyl-metánsulfonát [CAS číslo 62-50-0]
metyl-metánsulfonát [CAS číslo 66-27-3]
N-etyl-N-nitrózomočovina [CAS číslo 759-73-9]
mitomycín C [CAS číslo 50-07-7]
cyklofosfamid (monohydrát) [CAS číslo 50-18-0 (CAS číslo 6055-19-2)]
tretamín [CAS číslo 51-18-3]
kolchicín [CAS číslo 64-86-8] alebo vinblastín [CAS číslo 865-21-4] – ako aneugény

Negatívne kontroly

Zvieratá v negatívnych kontrolných skupinách by mali byť zahrnuté do každého odberu a inak by sa s nimi malo zaobchádzať rovnako ako s ovplyvnenými skupinami, nebudú však ovplyvnené testovanou chemikáliou. Ak sa pri podávaní testovanej chemikálie použije rozpúšťadlo/nosič, kontrolná skupina by mala dostať toto rozpúšťadlo/nosič. Ak sa však na základe historických údajov negatívnych kontrol pri každom odbere vzoriek v danom skúšobnom laboratóriu preukážu konzistentné údaje o variabilite medzi zvieratami a o frekvenciách buniek s mikrojadrami, môže byť pre negatívnu kontrolu potrebný len jeden odber. Ak sa na negatívne kontroly použije len jeden odber, mal by to byť odber vykonaný prvý raz v tejto štúdii.

▼M7

Ak sa použije periférna krv, je namiesto súbežnej negatívnej kontroly prijateľná vzorka pred ovplyvnením, a to v prípade krátkych štúdií, keď sú výsledné údaje v súlade s databázou historických kontrol skúšobného laboratória. Preukázalo sa, že v prípade potkanov má odber vzoriek malých objemov (napr. menej ako 100 µl/deň) pred ovplyvnením minimálny vplyv na frekvenciu mikrojadier v pozadí (25).

POSTUP

Počet zvierat a ich pohlavie

Vo všeobecnosti je reakcia vo forme mikrojadier u samcom a samíc podobná, a preto by sa väčšina štúdií mohla vykonávať so zvieratami ktoréhokoľvek pohlavia (26). Údaje, ktoré preukazujú relevantné rozdiely medzi samcami a samicami (napr. rozdiely v systémovej toxicite, metabolizme, biodostupnosti, toxicite kostnej drene atď. vrátane napr. štúdie na zistenie rozsahu), by boli v prospech používania oboch pohlaví. V takomto prípade môže byť vhodné vykonať štúdiu na oboch pohlaviach, a to napr. ako súčasť štúdie toxicity pri opakovaných dávkach. Ak sa použijú obe pohlavia, mohlo by byť vhodné použiť faktoriálny návrh. Podrobnosti o analýze údajov s použitím tohto návrhu sú uvedené v dodatku 2.

Mala by sa stanoviť veľkosť skupín na začiatku štúdie s cieľom poskytnúť minimálne 5 analyzovateľných zvierat jedného pohlavia alebo, ak sa použijú zvieratá oboch pohlaví, 5 z každého pohlavia za skupinu. Ak je možné, že vystavenie ľudí účinkom chemikálií závisí od pohlavia, ako napríklad v prípade niektorých liekov, test by sa mal vykonať na jedincoch príslušného pohlavia. Ako smerná hodnota v prípade bežných požiadaviek na maximálny počet zvierat by štúdia kostnej drene vykonaná podľa parametrov stanovených v bode 37 s troma dávkovými skupinami a so súbežnými negatívnymi a pozitívnymi kontrolami (každá skupina zložená z piatich zvierat jedného pohlavia) vyžadovala 25 a 35 zvierat.

Úrovne dávok

Ak sa z dôvodu, že ešte nie sú dostupné vhodné údaje na pomoc pri výbere dávky, vykoná predbežná štúdia na zistenie rozsahu, mala by sa vykonať v tom istom laboratóriu s použitím toho istého druhu, kmeňa, pohlavia a dávkovacej schémy, aké majú byť použité v hlavnej štúdii (27). Štúdia by sa mala zamerať na zistenie maximálnej tolerovanej dávky (MTD) definovanej ako najvyššia dávka, ktorá sa bude tolerovať bez dôkazu toxicity obmedzujúcej štúdiu, a to vzhľadom na trvanie štúdie [napr. indukovaním zníženia telesnej hmotnosti alebo hematopoetickej systémovej cytotoxicity, ale nie smrti ani znakov bolesti, utrpenia či stavu, ktorý si vyžaduje humánnu eutanáziu (28)].

Najvyššiu dávku možno takisto definovať ako dávka, ktorá spôsobuje toxicitu v kostnej dreni (napr. zníženie podielu nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov v kostnej dreni alebo v periférnej krvi o viac než 50 %, no nie na menej než 20 % kontrolnej hodnoty). Pri analýze CD71 pozitívnych buniek v periférnom krvnom obehu (t. j. prietokovou cytometrickou analýzou) však táto veľmi mladá frakcia nezrelých erytrocytov reaguje na toxické výzvy rýchlejšie než väčší RNA pozitívny kohort nezrelých erytrocytov. Preto môže byť zjavná vyššia toxicita evidentná pri plánoch akútnej expozície na skúmanie frakcie CD71 pozitívnych nezrelých erytrocytov v porovnaní s tými, ktoré označujú nezrelé erytrocyty na základe obsahu RNA. Z tohto dôvodu, ak v rámci pokusov prebieha ovplyvnenie päť alebo menej dní, najvyššiu dávku testovaných chemikálií spôsobujúcich toxicitu možno definovať ako dávku, ktorá spôsobuje štatisticky významné zníženie podielu CD71 pozitívnych nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov, no nie na menej než 5 % kontrolnej hodnoty (29).

▼M7

Chemikálie, ktoré vykazujú saturáciu toxikokinetických vlastností alebo indukujú detoxikačné procesy, ktoré môžu viesť k zníženiu expozície po dlhodobom podávaní, môžu byť vyňaté z kritérií na stanovenie dávok a mali by sa hodnotiť jednotlivo.

Na získanie informácií o reakcii na dávku by kompletná štúdia mala zahŕňať negatívnu kontrolnú skupinu a minimálne tri úrovne dávok vo všeobecnosti oddelené faktorom 2, ale nie vyšším ako 4. Ak testovaná chemikália nevyvoláva na základe štúdie na zistenie rozsahu alebo na základe existujúcich údajov toxicitu, najvyššia dávka pri 14-dňovom alebo dlhšom období podávania by mala byť 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň alebo 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň v prípade obdobia podávania kratšieho ako 14 dní. Ak však testovaná chemikália spôsobuje toxicitu, maximálna tolerovaná dávka by mala byť najvyššia podávaná dávka a použité úrovne dávky by mali podľa možnosti pokrývať rozsah od maximálnej dávky po dávku, ktorá spôsobuje slabú alebo nespôsobuje žiadnu toxicitu. Ak sa zistí toxicita v cieľovom tkanive (kostná dreň) pri všetkých testovaných úrovniach dávok, odporúča sa vykonanie ďalšej štúdie s netoxickými dávkami. Štúdie, ktorých cieľom je podrobnejšie charakterizovať kvantitatívne informácie o reakcii na dávku, môžu vyžadovať dodatočné dávkové skupiny. V prípade určitých druhov testovaných chemikálií (napr. humánne lieky), na ktoré sa vzťahujú osobitné požiadavky, sa tieto limity môžu líšiť.

Limitný test

Ak pokusy na stanovenie rozsahu dávok alebo existujúce údaje týkajúce sa súvisiacich kmeňov zvierat naznačujú, že dávkovacia schéma, aspoň pokiaľ ide o limitujúcu dávku (opísanú ďalej v texte), nespôsobuje žiadne pozorovateľné toxické účinky, (vrátane žiadneho poklesu proliferácie kostnej drene ani iný dôkaz cytotoxicity v cieľovom tkanive), a ak by sa genotoxicita na základe *in vitro* štúdií genotoxicity alebo na základe údajov týkajúcich sa štrukturálne príbuzných chemikálií neočakávala, potom nemusí byť potrebná úplná štúdia s použitím troch úrovní dávok, ak sa ukázalo, že testovaná(-é) chemikália(-e) dosahuje(-ú) cieľové tkanivo (kostná dreň). V takýchto prípadoch môže byť postačujúca jedna dávka na úrovni limitujúcej dávky. Ak sa chemikália podáva počas 14 dní alebo dlhšie, limitujúca dávka predstavuje 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň. V prípade období podávania chemikálie kratších než 14 dní predstavuje limitujúca dávka 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň.

Podávanie dávok

Pri plánovaní skúšky by sa mal zvážiť predpokladaný spôsob vystavenia ľudí. Preto možno zvoliť spôsoby vystavenia, ako napríklad prostredníctvom stravy, pitnej vody, topickou, subkutánnou cestou, intravenózne, perorálne (pomocou sondy), inhalačne, intratracheálne alebo implantačne, ako opodstatnené spôsoby. V každom prípade by sa mal zvoliť spôsob, ktorým sa zabezpečí primeraná vystavenie cieľového(-ých) tkaniva(-ív). Vo všeobecnosti sa neodporúča použitie intraperitoneálnej injekcie, keďže to nie je zamýšľaný spôsob vystavenia ľudí, a mal by sa použiť iba v prípade, že je k dispozícii osobitné vedecké zdôvodnenie. Ak je testovaná chemikália primiešaná do krmiva alebo pitnej vody, najmä v prípade jednej dávky, treba venovať pozornosť tomu, aby sa medzi spotrebou potravy a vody a odberom vzorky ponechal dostatočný čas, aby sa umožnilo zistenie účinkov (pozri bod 37). Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže naraz podávať sondou alebo injekciou, závisí od veľkosti testovaného zvieraťa. Objem by za bežných okolností nemal prekročiť 1 ml/100 g telesnej hmotnosti okrem vodných roztokov, pri ktorých sa môže použiť najviac 2 ml/100 g. Požitie väčších ako uvedených objemov by malo byť opodstatnené. S výnimkou dráždivých alebo žieravých testovaných chemikálií, ktoré pri vyšších koncentráciách zvyčajne zhoršia účinky, by sa variabilita v testovanom objeme mala minimalizovať tým, že sa koncentrácia upraví tak, aby sa na všetkých úrovniach dávok zabezpečil stály objem vo vzťahu k telesnej hmotnosti.

▼M7

Harmonogram ovplyvňovania

Uprednostňujú sa 2 alebo viaceré ovplyvnenia v 24-hodinových intervaloch, najmä v prípade začlenenia tohto testu do iných toxikologických štúdií toxicity. Alternatívou môže byť jednorazové ovplyvnenie, ak je vedecky opodstatnené (napr. testované chemikálie známe ako blokátory bunkového cyklu). Testované chemikálie môžu byť podávané v rozdelenej dávke, t. j. dve alebo viaceré ovplyvnenia v jeden deň s časovým odstupom najviac 2 – 3 hodiny, čím sa uľahčí podávanie veľkého objemu chemikálie. Za týchto okolností alebo pri podávaní testovanej chemikálie inhalačne by sa čas odberu vzoriek mal naplánovať na základe posledného podania dávky alebo skončenia vystavenia.

Test sa môže vykonať na myšiach alebo potkanoch jedným z týchto troch spôsobov:

a) Zvieratám sa jednorazovo podá testovaná chemikália. Vzorky kostnej drene sa odoberú minimálne dvakrát (nezávislým skupinám zvierat), pričom odber sa začne najskôr 24 hodín po ovplyvnení, ale nie neskôr ako 48 hodín po ovplyvnení s primeraným(-i) intervalom(-mi) medzi odbermi vzoriek, pokiaľ o testovanej chemikálii nie je známe, že má výnimočne dlhý polčas. Vykonanie odberu skôr ako 24 hodín po ovplyvnení by sa malo zdôvodniť. Vzorky periférnej krvi sa odoberajú minimálne dvakrát (tej istej skupine zvierat), pričom odber sa začne najskôr 36 hodín po ovplyvnení, a to s primeraným(-i) intervalom(-mi) po prvom odbere vzorky, nie však neskôr ako po 72 hodinách. V čase prvého odberu by mali byť všetky dávkové skupiny ovplyvnené a mali by sa odobrať vzorky na analýzu; pri neskoršom(-ích) odbere(-och) je však potrebné podať len najvyššiu dávku. Ak sa pri jednom odbere zistí pozitívna reakcia, nevyžaduje sa doplnkový odber vzorky, pokiaľ nie sú potrebné kvantitatívne informácie o reakcii na dávku. Opísané časy odberu sú dôsledkom kinetiky objavovania sa a miznutia mikrojadier v týchto dvoch tkanivových zložkách.

b) Ak sa vykoná ovplyvnenie dvakrát denne (napríklad dve ovplyvnenia v 24-hodinových intervaloch), vzorky by sa mali odobrať raz z kostnej drene medzi 18. a 24. hodinou po poslednom ovplyvnení alebo raz z periférnej krvi medzi 36. a 48. hodinou po poslednom ovplyvnení (30). Opísané časy odberu sú dôsledkom kinetiky objavovania sa a miznutia mikrojadier v týchto dvoch tkanivových zložkách.

c) Ak sa vykoná ovplyvnenie trikrát alebo viackrát denne (napríklad tri ovplyvnenia alebo viac ovplyvnení v približne 24-hodinových intervaloch), vzorky z kostnej drene by sa mali odobrať najneskôr 24 hodín po poslednom ovplyvnení a vzorky z periférnej krvi by sa mali odobrať najneskôr 40 hodín po poslednom ovplyvnení (31). Táto možnosť ovplyvnenia zahŕňa kombináciu kométového testu (comet assay) (napr. odber vzoriek 2 – 6 hodín po poslednom ovplyvnení) s mikrojadrovým testom a integráciu mikrojadrového testu so štúdiami toxicity pri opakovaných dávkach. Akumulované údaje naznačujú, že indukciu mikrojadier možno pozorovať v týchto širších časových rámcoch, ak došlo k 3 alebo viacerým podaniam (15).

Iné režimy podávania dávok alebo odberu vzoriek možno použiť vtedy, ak je to relevantné a vedecky opodstatnené, a s cieľom uľahčiť spojenie s inými testami toxicity.

Pozorovania

Najmenej raz denne by sa mali vykonať všeobecné klinické pozorovania testovaných zvierat a zaznamenať klinické príznaky, najlepšie každý deň v rovnakom čase a s ohľadom na časový interval najintenzívnejších predpokladaných účinkov po podaní dávky. Počas obdobia podávania dávok je potrebné aspoň dvakrát denne sledovať chorobnosť a úmrtnosť zvierat. Všetky zvieratá by sa mali odvážiť na začiatku štúdie, aspoň raz za týždeň počas štúdií s opakovanou dávkou a potom pri utratení. V prípade štúdií, ktoré trvajú aspoň jeden týždeň, by sa malo aspoň raz za týždeň vykonať meranie spotreby potravy.

▼M7

Ak sa testovaná chemikália podáva v pitnej vode, spotreba vody by sa mala merať pri každej výmene vody a aspoň raz za týždeň. Zvieratá, ktoré vykazujú neletálne ukazovatele nadmernej toxicity, by mali byť humánne utratené pred ukončením testovacieho obdobia (28). Za určitých okolností by sa mohla monitorovať telesná teplota zvierat, keďže hypertermia a hypotermia vyvolané ovplyvnením mohli prispieť k falošným výsledkom (32) (33) (34).

Vystavenie cieľového tkaniva

Vzorka krvi by sa mala odobrať vo vhodnom(-ých) čase(-och), aby bolo možné preskúmať úrovne testovaných chemikálií v plazme na účely preukázania, že došlo k vystaveniu kostnej drene, ak je to opodstatnené a ak neexistujú iné údaje o expozícii (pozri bod 48).

Preparát kostnej drene/krvi

Bunky kostnej drene sa zvyčajne získavajú zo stehnových kostí (femur) alebo píšťal (tibia) zvierat ihneď po humánnej eutanázii. Bunky sa zvyčajne odoberú, pripravia sa z nich preparáty a zafarbia sa použitím zavedených metód. Malé objemy periférnej krvi možno získať v súlade s primeranými normami týkajúcimi sa dobrých podmienok zvierat, a to buď pomocou metódy, ktorá umožňuje prežitie testovaného zvieraťa, ako je napríklad získanie krvi z chvostovej žily alebo inej vhodnej žily, alebo srdcovou punkciou alebo odberom vzoriek z veľkej cievy pri utratení zvierat. V prípade erytrocytov získaných z kostnej drene alebo periférnej krvi možno bunky v závislosti od metódy analýzy ihneď supravitálne zafarbiť (16) (17) (18), bunky sa rozotrú na podložnom sklíčku a vzniknuté preparáty sa zafarbia a mikroskopicky vyhodnotia, alebo sa fixujú a vhodne zafarbia na účely prietokovej cytometrickej analýzy. Použitie farbiva so špecifickou väzbou na DNA [napríklad akridínová oranžová (35) alebo Hoechst 33258 plus pyronín-Y (36)] môže eliminovať niektoré umelo vzniknuté štruktúry buniek spojené s používaním farbiva bez špecifickej väzby na DNA. Táto výhoda nebráni používaniu konvenčných farbív (napríklad Giemsa na účely mikroskopickej analýzy). Použiť možno takisto dodatočné systémy [napríklad celulózové kolóny na odstránenie buniek s jadrom (37) (38)], a to za predpokladu, že sa preukázala kompatibilita týchto systémov s prípravou vzoriek v laboratóriu.

Ak sú tieto metódy uplatniteľné, na identifikáciu povahy mikrojadier (chromozómy/fragmenty chromozómov) s cieľom zistiť, či je mechanizmus indukcie mikrojadier dôsledkom klastogénnych a/alebo aneugénnych procesov, možno použiť protilátky kinetochoru (39), FISH s pancentromérovými sondami DNA (40) alebo značenie *in situ* pomocou primerov špecifických pre pancentroméru spolu s vhodným odfarbovacím roztokom DNA (41). Na rozlišovanie medzi klastogénmi a aneugénmi možno použiť aj iné metódy, ak sa ukázalo, že sú účinné.

Analýza (ručná a automatizovaná)

Všetky sklíčka alebo vzorky na analýzu vrátane pozitívnych a negatívnych kontrol by sa mali pred každou analýzou nezávisle označiť kódmi a mali by byť náhodné, aby hodnotiaci používajúci manuálnu metódu nebol oboznámený s podmienkami ovplyvnenia; takéto kódovanie nie je potrebné pri automatizovaných systémoch hodnotenia, ktoré sa neopierajú o vizuálnu kontrolu a nemôžu byť ovplyvnené zaujatosťou prevádzkovateľa. Pri každom zvierati sa stanovuje podiel nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov (zrelých plus nezrelých), pričom sa počíta celkovo najmenej 500 erytrocytov v prípade kostnej drene a 2 000 erytrocytov v prípade periférnej krvi (42). Pri výskyte nezrelých erytrocytov s mikrojadrami by sa malo hodnotiť aspoň 4 000 nezrelých erytrocytov na jedno zviera (43). Ak databáza historických negatívnych kontrol naznačuje, že priemerná hodnota pozaďovej frekvencie nezrelých erytrocytov s mikrojadrami je < 0,1 % v skúšobnom laboratóriu, malo by sa zvážiť hodnotenie dodatočných

▼M7

buniek. Pri analyzovaní vzoriek by podiel nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov u ovplyvnených zvierat nemal byť nižší ako 20 % podielu kontroly nosiča/rozpúšťadla pri mikroskopickom hodnotení a zároveň by nemal byť nižší než približne 5 % podielu kontroly nosiča/rozpúšťadla pri hodnotení CD71+ nezrelých erytrocytov cytometrickými metódami (pozri bod 31) (29). Napríklad ak je v prípade skúšky kostnej drene hodnotenej mikroskopicky podiel nezrelých erytrocytov v kostnej dreni 50 %, horná hranica toxicity by bola 10 % nezrelých erytrocytov.

Pretože potkania slezina vychytáva a ničí erytrocyty s mikrojadrami, je na zachovanie vysokej citlivosti skúšky pri analýze periférnej krvi potkanov vhodnejšie obmedziť analýzu nezrelých erytrocytov s mikrojadrami na najmladšiu frakciu. Ak sa použijú automatizované metódy analýzy, možno tieto najmenej zrelé erytrocyty identifikovať na základe ich vysokého obsahu RNA alebo vysokej úrovne transferínových receptorov (CD71+) na ich povrchu (31). Z priameho porovnania rôznych metód farbenia však vyplýva, že uspokojivé výsledky možno dosiahnuť rôznymi spôsobmi vrátane konvenčného farbenia pomocou farbiva akridínová oranžová (3) (4).

PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Spracovanie výsledkov

Údaje o jednotlivých zvieratách by sa mali uvádzať v tabuľkovej forme. Pri každom zvierati podrobenom analýze by sa mal samostatne uviesť počet hodnotených nezrelých erytrocytov, počet nezrelých erytrocytov s mikrojadrami a podiel nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov. V prípade, že sa myši ovplyvňujú nepretržite počas 4 týždňov alebo dlhšie, mali by sa uvádzať aj údaje o počte a podiele zrelých erytrocytov s mikrojadrami, ak boli odobraté. Mali by sa uvádzať aj údaje o toxicite a klinických príznakoch u zvierat.

Kritériá prijateľnosti

Prijateľnosť testu určujú tieto kritériá:

a) Údaje o súbežných negatívnych kontrolách sa pokladajú za prijateľné na to, aby sa doplnili do databázy historických kontrol laboratória (pozri body 15 – 18).

b) Súbežné pozitívne kontroly alebo kontroly hodnotenia by mali vyvolať reakcie, ktoré sú zlučiteľné s reakciami generovanými v databáze historických pozitívnych kontrol, a viesť k štatisticky významnému nárastu v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou (pozri body 24 – 25).

c) Vykonala sa analýza primeraného počtu dávok a buniek.

d) Kritériá výberu najvyššej dávky sú v súlade s kritériami opísanými v bodoch 30 – 33.

Vyhodnotenie a výklad výsledkov

Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, testovaná chemikália sa pokladá za jasne pozitívnu, ak:

a) aspoň jedna z ovplyvnených skupín vykazuje štatisticky významné zvýšenie frekvencie nezrelých erytrocytov s mikrojadrami v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou;

b) pri posúdení pomocou vhodného testu trendu sa preukáže, že aspoň pri jednom odbere vzorky toto zvýšenie závisí od dávky, a

c) ktorýkoľvek z týchto výsledkov je mimo rozdelenia historických údajov negatívnych kontrol (napr. 95 % regulačné medze podľa Poissonovho rozdelenia).

▼M7

Ak sa preskúma len najvyššia dávka v konkrétnom čase odberu vzorky, testovaná chemikália sa pokladá za jasne pozitívnu, ak dôjde k štatisticky významnému zvýšeniu v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou a výsledky sú mimo rozdelenia historických údajov negatívnych kontrol (napr. 95 % regulačné medze podľa Poissonovho rozdelenia). Odporúčania týkajúce sa najvhodnejších štatistických metód možno nájsť v literatúre (44) (45) (46) (47). Pri vykonávaní analýzy vzťahu medzi dávkou a reakciou by sa mali analyzovať aspoň tri ovplyvnené dávkové skupiny, v rámci ktorých sa podáva určitá dávka. Pri štatistických testoch by sa malo zviera použiť ako experimentálna jednotka. Pozitívne výsledky mikrojadrového testu naznačujú, že testovaná chemikália indukuje mikrojadrá, ktoré sú výsledkom chromozómového poškodenia alebo poškodenia mitotického aparátu v erytroblastoch testovaného druhu. V prípade, že sa vykonal test na zistenie centromér v mikrojadrách, testovaná chemikália, ktorá produkuje mikrojadrá obsahujúce centroméry (centromérická DNA alebo kinetochor, ktoré sú príznačné pre stratu celých chromozómov), je dôkazom toho, že testovaná chemikália je aneugén.

Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, testovaná chemikália sa pokladá za jasne negatívnu, ak pri všetkých preskúmaných podmienkach pokusu platí, že:

a) žiadna z ovplyvnených skupín nevykazuje štatisticky významné zvýšenie frekvencie nezrelých erytrocytov s mikrojadrami v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou;

b) pri posúdení pomocou vhodného testu trendu sa preukáže, že počas žiadneho odberu vzorky nedochádza k zvýšeniu v závislosti od dávky;

c) všetky výsledky sú v rámci rozdelenia historických údajov negatívnych kontrol (napr. 95 % regulačné medze podľa Poissonovho rozdelenia) a

d) došlo k vystaveniu kostnej drene účinkom testovanej(-ých) chemikálie(-í).

Odporúčania týkajúce sa najvhodnejších štatistických metód možno nájsť v literatúre (44) (45) (46) (47). Ako dôkaz o vystavení kostnej drene účinkom testovanej chemikálie môže slúžiť zníženie pomeru medzi nezrelými a zrelými erytrocytmi alebo meranie hladín testovanej chemikálie v plazme alebo krvi. V prípade intravenózneho podania nie je potrebný dôkaz o vystavení. Alternatívne možno na preukázanie vystavenia kostnej drene použiť údaje ADME získané v nezávislej štúdii s použitím tej istej cesty podania a toho istého druhu. Negatívne výsledky naznačujú, že testovaná chemikália za daných testovacích podmienok nevytvára mikrojadrá v nezrelých erytrocytoch testovaného druhu.

Neexistuje požiadavka na overenie jasnej pozitívnej alebo negatívnej reakcie.

V prípadoch, keď reakcia nie je jasne negatívna ani pozitívna, a s cieľom pomôcť stanoviť biologickú relevantnosť výsledku (napr. slabé alebo hraničné zvýšenie), by na posúdenie údajov malo slúžiť odborné posúdenie a/alebo ďalšie skúmanie vykonaných pokusov. V niektorých prípadoch by mohlo byť užitočné vykonať analýzu viacerých buniek alebo zopakovať pokus s pozmenenými podmienkami.

V zriedkavých prípadoch, dokonca aj po ďalších skúmaniach, údaje neumožnia vyvodiť záver, že testované chemikálie vedú k negatívnym alebo pozitívnym výsledkom, a preto sa štúdia uzavrie ako štúdia „s nejasným výsledkom“.

Skúšobný protokol

Skúšobný protokol by mal zahŕňať tieto informácie:

Zhrnutie

Testovaná chemikália:

— zdroj, číslo šarže, konečný dátum použitia, ak sú tieto informácie k dispozícii,

▼M7

— stabilita testovanej chemikálie, ak je známa.

Jednozložková látka:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti;

— identifikácia chemikálie, ako je názov IUPAC alebo CAS, CAS číslo, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, a to v prípade potreby a uskutočniteľnosti atď.

Mnohozložková látka, UVCB a zmesi:

— charakterizovaná pokiaľ možno chemickou identitou (pozri vyššie), kvantitatívnym výskytom a relevantnými fyzikálno-chemickými vlastnosťami zložiek.

Príprava testovanej chemikálie:

— zdôvodnenie voľby nosiča,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa,

— príprava potravy, pitnej vody alebo inhalačných aplikačných foriem,

— analytické stanovenia týkajúce sa aplikačných foriem (napr. stabilita, homogenita, nominálne koncentrácie) v prípade, že sa vykonáva.

Testované zvieratá:

— použitý druh/kmeň a zdôvodnenie jeho použitia;

— počet, vek a pohlavie zvierat;

— zdroj, podmienky umiestnenia, potrava atď.;

— metóda na jedinečnú identifikáciu zvierat;

— v prípade krátkodobých štúdií: hmotnosť jednotlivých zvierat na začiatku a na konci testu; v prípade štúdií dlhších ako jeden týždeň: hmotnosť jednotlivých zvierat počas štúdie a konzumácia potravy. Mal by sa zahrnúť rozsah telesnej hmotnosti, priemer a štandardná odchýlka pre každú skupinu.

Podmienky testu:

— údaje o pozitívnych a negatívnych kontrolách (rozpúšťadlo/nosič),

— údaje zo štúdie na zistenie rozsahu, ak sa vykonala,

— odôvodnenie voľby úrovne dávky,

— podrobné údaje o príprave testovanej chemikálie,

— podrobné údaje o podávaní testovanej chemikálie,

— zdôvodnenie spôsobu a trvania podávania,

— metódy overovania, že testovaná(-é) chemikália(-e) dosiahla(-i) všeobecnú cirkuláciu alebo cieľové tkanivo,

▼M7

— skutočná dávka (mg/kg telesnej hmotnosti/deň) vypočítaná z koncentrácie testovanej chemikálie (ppm) v potrave/pitnej vode a zo spotreby potravy/pitnej vody, ak sa uplatňuje,

— podrobné údaje o kvalite potravy a vody,

— spôsob utratenia,

— metóda analgézie (v prípade použitia),

— podrobný opis harmonogramu aplikácie a harmonogramu odberu vzoriek a zdôvodnenie ich voľby,

— metódy prípravy preparátov,

— postupy izolácie a uchovávania vzoriek,

— metódy merania toxicity,

— kritériá hodnotenia nezrelých erytrocytov s mikrojadrami,

— počet analyzovaných buniek u každého zvieraťa pri určovaní frekvencie nezrelých erytrocytov s mikrojadrami a na určovanie pomeru medzi nezrelými a zrelými erytrocytmi,

— kritériá prijateľnosti štúdie,

— v prípade potreby metódy, ako je použitie protilátok kinetochoru alebo sond DNA špecifických pre centroméru, na zistenie toho, či mikrojadrá obsahujú celé alebo fragmentované chromozómy.

Výsledky:

— stav zvieraťa pred testovaním a počas doby testovania vrátane príznakov toxicity,

— podiel nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov,

— počet nezrelých erytrocytov s mikrojadrami v prípade každého zvieraťa samostatne,

— priemerná hodnota ± štandardná odchýlka počtu nezrelých erytrocytov s mikrojadrami na skupinu,

— vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je možné ho určiť,

— použité štatistické analýzy a metódy,

— údaje o súbežných negatívnych a pozitívnych kontrolách s rozsahmi, priemernými hodnotami a štandardnými odchýlkami,

— historické údaje o negatívnych a pozitívnych kontrolách s rozsahmi, priemernými hodnotami, štandardnými odchýlkami a 95 % regulačnými medzami pre rozdelenie, ako aj príslušné časové obdobie a počet údajových bodov,

— údaje na podporu toho, že došlo k vystaveniu kostnej drene,

— prípadne údaje o charakterizácii, ktoré naznačujú, či mikrojadrá obsahujú celé alebo fragmentované chromozómy,

— splnené kritériá pozitívnej alebo negatívnej reakcie.

▼**M7**

Diskusia o výsledkoch

Záver.

Referencie.

LITERATÚRA

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

Dodatok 1

DEFINÍCIE

Centroméra: oblasť(-ti) chromozómu, v ktorej(-ých) sa vlákna deliaceho vretienka pripájajú k chromozómu počas delenia bunky a ktorá(-é) umožňuje(-ú) riadny pohyb dcérskych chromozómov k pólom dcérskych buniek.

Chemikália: látka alebo zmes.

Erytroblast: skoré štádium vývoja erytrocytu bezprostredne predchádzajúce štádiu nezrelého erytrocytu, v ktorom bunka ešte obsahuje jadro.

Kinetochor: bielkovinová štruktúra vytvárajúca sa na centromére eukaryotických buniek, ktorá spája chromozóm s mikrotubulovými polymérmi z mitotického vretienka počas mitózy a meiózy a funguje počas delenia buniek tak, že od seba odtrháva sesterské chromatídy.

Mikrojadrá: malé jadrá doplňujúce hlavné jadrá buniek a oddelené od nich, ktoré sa vytvárajú počas telofázy mitózy (meiózy) oneskorenými chromozómovými fragmentmi alebo celými chromozómami.

Normochromatický alebo zrelý erytrocyt: úplne zrelý erytrocyt, ktorý stratil reziduálnu RNA, ktorá zostáva po enukleácii, a/alebo ktorý stratil iné krátko žijúce bunkové markéry, ktoré spravidla zmiznú po enukleácii po konečnom delení erytroblastov.

Polychromatický alebo nezrelý erytrocyt: novovzniknutý erytrocyt na medzistupni vývoja, ktorý sa v dôsledku prítomnosti reziduálnej RNA v novovzniknutej bunke zafarbí modrými aj červenými zložkami klasických krvných farbív, ako napr. Giemsa od Wrighta. Takéto novovzniknuté bunky sú približne rovnaké ako retikulocyty, ktoré sa vizualizujú použitím vitálneho farbiva spôsobujúceho zhlukovanie reziduálnej RNA do retikula. V súčasnosti sa na identifikáciu novovzniknutých červených krviniek používajú iné metódy vrátane monochromatického farbenia RNA fluorescenčnými farbivami alebo označovanie krátko žijúcich povrchových markérov, ako je CD71, fluorescenčnými protilátkami. Polychromatické erytrocyty, retikulocyty, ako aj CD71 pozitívne erytrocyty sú nezrelé erytrocyty, hoci každý z nich má trochu odlišné vekové rozdelenie.

Retikulocyt: novo vzniknutý erytrocyt zafarbený vitálnym farbivom, ktoré spôsobuje zhlukovanie reziduálnej bunkovej RNA do charakteristického retikula. Retikulocyty a polychromatické erytrocyty majú podobné bunkové vekové rozdelenie.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

▼M7

Dodatok 2

FAKTORIÁLNY NÁVRH NA IDENTIFIKÁCIU ROZDIELOV MEDZI POHLAVIAMI V *IN VIVO* MIKRIOJADROVEJ SKÚŠKE

Faktoriálny návrh a jeho analýza

V tomto návrhu sa testuje minimálne 5 samcov a 5 samíc na každej úrovni koncentrácie, čo vedie k použitiu minimálne 40 zvierat (20 samčekov a 20 samičiek, spolu s príslušnými pozitívnymi kontrolami).

Uvedený návrh, ktorý predstavuje jeden z jednoduchších faktoriálnych návrhov, je ekvivalentný s dvojfaktorovou analýzou rozptylu, pričom pohlavie a úroveň koncentrácie sú hlavnými účinkami. Údaje možno analyzovať použitím mnohých štandardných softvérových balíkov pre štatistiku, ako sú napr. SPSS, SAS, STATA, Genstat, ako aj pomocou „R“.

Pomocou analýzy sa variabilita v súbore údajov rozdelí na variabilitu medzi pohlaviami, variabilitu medzi koncentráciami a variabilitu v súvislosti s interakciou medzi pohlaviami a koncentráciami. Každá z podmienok sa testuje voči odhadu variability medzi paralelnými zvieratami v rámci skupín zvierat rovnakého pohlavia pri rovnakej koncentrácii. Podrobné informácie o použitej metodike sú dostupné v mnohých štandardných štatistických príručkách (pozri odkazy) a v rámci podpory poskytnutej v balíkoch pre štatistiku.

Analýza prebieha formou preskúmania podmienky interakcie medzi pohlavím a koncentráciou v tabuľke ANOVA ([1]). Ak nenastane výrazná interakcia kombinovaných hodnôt (obe pohlavia a rôzne koncentrácie testovanej látky), platné štatistické testy ANOVA poskytnú informáciu o významnosti rozdielov medzi porovnávanými skupinami a parametrami na základe ich vnútornej variability.

Analýza pokračuje rozdelením odhadovaných hodnôt pre variabilitu medzi koncentráciami na kontrasty, ktoré umožňujú testovanie na lineárne a kvadratické kontrasty reakcií pri všetkých úrovniach koncentrácií. Ak existuje významná interakcia medzi pohlavím a koncentráciou, možno túto podmienku rozdeliť aj na kontrast interakcie medzi lineárnou hodnotou a pohlavím a kontrast interakcie medzi kvadratickou hodnotou a pohlavím. Tieto podmienky umožňujú testovanie toho, či sú reakcie na koncentráciu u oboch pohlaví paralelné, alebo či je reakcia každého pohlavia odlišná.

Na základe odhadov týkajúcich sa združených údajov v rámci skupinovej variability možno vykonať párové testy na zistenie rozdielu medzi priemernými hodnotami. Tieto porovnania by sa mohli vykonať medzi priemernými hodnotami pre obe pohlavia a medzi priemernými hodnotami pre rôzne úrovne koncentrácie, ako sú napríklad porovnania s úrovňami negatívnych kontrol. V prípadoch, keď dochádza k významnej interakcii, možno vykonať porovnania medzi priemernými hodnotami rôznych koncentrácií v rámci jedného pohlavia alebo medzi priemernými hodnotami pohlaví pri rovnakej koncentrácii.

Odkazy

Existuje mnoho štatistických príručiek, v ktorých sa rozoberá teória, návrh, metodika, analýza a výklad faktoriálnych návrhov počnúc dvoma najjednoduchšími faktorovými analýzami po komplexnejšie formy používané v metodike plánovania experimentu. Ide o tento neúplný zoznam. Niektoré knihy poskytujú spracované príklady porovnateľných návrhov, v niektorých prípadoch s kódom na vykonanie analýz pomocou rôznych softvérových balíkov.

([1]) Štatistici, ktorí si zvolia vzorový postup, ako napríklad použitie všeobecných lineárnych modelov (General Linear Models, GLM), môžu vykonať analýzu odlišným, no porovnateľným spôsobom, nemusia však nevyhnutne vychádzať z tabuľky ANOVA, ktorá pochádza z obdobia, kedy sa pri výpočte štatistík vypracúvaných v období pred počítačovou érou uplatňovali algoritmické postupy.

▼**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. **MUTAGÉNNOSŤ: BAKTERIÁLNY TEST REVERZNÝCH MUTÁCIÍ**

1. **METÓDA**

Táto metóda je obdobou metódy OECD TG 471 bakteriálneho testu reverzných mutácií (1997).

1.1. ÚVOD

Bakteriálny test reverzných mutácií používa aminokyseliny vyžadujúce kmene *Salmonella typhimurium* a *Escherichia coli* na zistenie bodových mutácií, ktoré zahŕňajú nahradenie, pridanie alebo vymazanie jednej alebo niekoľkých bázových párov DNA (1) (2) (3). Princípom bakteriálneho testu reverzných mutácií je, že zisťuje mutácie, ktoré vracajú do pôvodného stavu mutácie prítomné v testovacích kmeňoch a obnovujú funkčnú schopnosť baktérií syntetizovať esenciálne aminokyseliny. Reverzné baktérie sa zisťujú prostredníctvom ich schopnosti rásť v neprítomnosti aminokyseliny vyžadovanej rodičovským testovacím kmeňom.

Bodové mutácie sú príčinou mnohých ľudských genetických chorôb a existujú dostatočné dôkazy, že bodové mutácie onkogénov a génov na potláčanie nádorov somatických buniek sú prítomné pri výskyte rakoviny u ľudí a pokusných zvierat. Bakteriálny test reverzných mutácií je rýchly, lacný a relatívne ľahko uskutočniteľný. Mnohé z testovacích kmeňov majú viacero vlastností, ktoré spôsobujú ich väčšiu citlivosť na zistenie mutácií vrátane reaktívnych DNA sekvencií na reverzných miestach, zvýšenej bunkovej permeability na veľké molekuly a eliminácie opravných systémov DNA alebo zlepšenia opravných procesov DNA náchylných na chyby. Špecifickosť testovacích kmeňov môže poskytnúť užitočné informácie o typoch mutácií, ktoré sú vyvolané genotoxickými činiteľmi. Dostupná je veľká databáza výsledkov pre rôzne štruktúry pre bakteriálny test reverzných mutácií a boli vyvinuté dobré metódy na testovanie chemikálií s rôznymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami vrátane prchavých zmesí.

Pozri tiež všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Test reverzných mutácií buď v *Salmonella typhimurium*, alebo *Escherichia coli* zisťuje mutáciu v kmeni vyžadujúcom aminokyselinu (histidín alebo tryptofán) na vytvorenie kmeňa nezávislého od vonkajšieho prívodu aminokyseliny.

Substitučné mutagény bázového páru sú činitele, ktoré spôsobujú bázovú zmenu DNA. V teste reverzných mutácií sa môže táto zmena odohrať na mieste pôvodnej mutácie alebo na inom mieste bakteriálneho genómu.

Konštrukčné mutagény sú činitele, ktoré spôsobujú pridanie alebo vymazanie jedného alebo viacerých bázových párov DNA, čím menia čítaciu konštrukciu DNA.

▼B

1.3. ÚVODNÉ ÚVAHY

Bakteriálny test reverzných mutácií využíva prokaryotické bunky, ktoré sa od buniek cicavcov odlišujú vo faktoroch, ako je vstrebávanie, metabolizmus, chromozómová štruktúra a opravné procesy DNA. Testy uskutočnené *in vitro* vo všeobecnosti vyžadujú použitie exogénneho zdroja metabolickej aktivácie. *In vitro* systémy metabolickej aktivácie nemôžu plne napodobniť *in vivo* podmienky cicavcov. Test preto neposkytuje priame informácie o mutagénnej a karcinogénnej potencii látky u cicavcov.

Bakteriálny test reverzných mutácií sa bežne používa ako počiatočný prieskum genologickej aktivity, a najmä aktivity vyvolávajúcej bodové mutácie. Rozsiahla databáza ukázala, že mnohé chemikálie, ktoré sú v tomto teste pozitívne, tiež vykazujú mutagénnu aktivitu v iných testoch. Existujú príklady mutagénnych činiteľov, ktoré sa nezistili týmto testom; príčina týchto chýb sa dá pripísať špecifickej povahe zisteného stavu, rozdielom v metabolickej aktivácii alebo rozdielom v biodostupnosti. Na druhej strane faktory, ktoré zvyšujú citlivosť bakteriálneho testu reverzných mutácií, môžu viesť k preceneniu mutagénnej aktivity.

Bakteriálny test reverzných mutácií nemusí byť vhodný na hodnotenie určitých tried chemikálií, napríklad vysoko baktericídnych zlúčenín (napríklad určitých antibiotík) a tých, o ktorých sa predpokladá (alebo je o nich známe), že špecificky narúšajú replikačný systém buniek cicavcov (napríklad niektoré inhibítory topoizomerázy a niektoré nukleozidové napodobeniny). V takýchto prípadoch sú vhodnejšie testy mutácií u cicavcov.

Hoci mnohé zlúčeniny, ktoré sú v tomto teste pozitívne, sú karcinogénmi u cicavcov, korelácia nie je absolútna. Závisí to od triedy chemikálie a existujú karcinogény, ktoré sa týmto testom nezistia, pretože pôsobia prostredníctvom iných negenotoxických mechanizmov alebo mechanizmov neprítomných v bunkách baktérií.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Suspenzie bakteriálnych buniek sú vystavené testovacej látke v prítomnosti a neprítomnosti exogénneho systému metabolickej aktivácie. Pri metóde použitia misiek sa tieto suspenzie zmiešajú s krycím agarom a umiestnia sa na veľmi malé médium. Pri metóde predinkubácie sa dávkovaná zmes inkubuje a potom zmieša s krycím agarom pred umiestnením na veľmi malé médium. Pri oboch technikách sa po dvoch alebo troch dňoch inkubácie spočítajú reverzné kolónie a porovnajú sa s počtom spontánnych kolónií revertantov na kontrolných miskách.

Boli opísané viaceré postupy uskutočnenia bakteriálneho testu reverzných mutácií. Medzi bežne používané patrí metóda použitia misiek (1) (2) (3) (4), predinkubačná metóda (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluktuačná metóda (9) (10) a suspenzná metóda (11). Opísané boli aj modifikácie testovania plynov a pár (12).

▼B

Postupy opísané v tejto metóde sa týkajú najmä metódy použitia misky a predinkubačnej metódy. Obe sú prijateľné pre uskutočňovanie pokusov s metabolickou aktiváciou aj bez nej. Niektoré látky sa dajú efektívnejšie zistiť použitím predinkubačnej metódy. Tieto látky patria do tried chemikálií, ktoré zahŕňajú alifatické nitrozamíny s krátkymi reťazcami, bivalentné kovy, aldehydy, azofarbivá a diazozlúčeniny, pyrolizidínové alkaloidy, alylové zlúčeniny a nitrozlúčeniny (3). Zistilo sa, že niektoré triedy mutagénov sa nie vždy objavia s použitím štandardných postupov, ako napríklad metódou použitia misky alebo predinkubačnou metódou. Tieto mutagény sa považujú za „osobitné prípady“ a na ich zistenie sa dôrazne odporúča použitie alternatívnych postupov. Identifikované boli nasledujúce „osobitné prípady“ (spolu s príkladmi postupov, ktoré by sa dali použiť na ich zistenie): azofarbivá a diazozlúčeniny (3) (5) (6) (13), plyny a prchavé chemikálie (12) (14) (15) (16) a glykozidy (17) (18). Odchýlka od štandardného postupu sa musí vedecky zdôvodniť.

1.5. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.5.1. **Prípravné práce**

1.5.1.1. *Baktérie*

Čerstvé kultúry baktérií sa nechajú vyrásť do neskorého exponenciálneho alebo skorého stacionárneho štádia rastu (približne 10^9 buniek na ml). Kultúry v neskorom stacionárnom štádiu sa nepoužívajú. Je dôležité, aby kultúry použité pri pokuse obsahovali vysoký podiel životaschopných baktérií. Podiel sa dá preukázať buď z minulých kontrolných údajov o rastových krivkách, alebo pri každom pokuse prostredníctvom určenia počtu životaschopných buniek miskovým pokusom.

Odporúčaná inkubačná teplota je 37 °C.

Používa sa najmenej päť kmeňov baktérií. Tieto zahŕňajú štyri kmene *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 alebo TA 97a alebo TA 97, TA 98 a TA 100), ktoré boli v laboratóriách preukázateľne spoľahlivé a reproduktívne reaktívne. Tieto štyri kmene *S. typhimurium* majú GC bázové páry na primárnom reverznom mieste a je známe, že nemusia zistiť určité oxidujúce mutagény, medzispájacie činitele a hydrazíny. Takéto látky sa dajú zistiť pomocou kmeňov *E. coli* WP2 alebo *S. typhimurium* TA 102 (19), ktoré majú AT bázu na primárnom reverznom mieste. Odporúčanou kombináciou kmeňov je preto:

— *S. typhimurium* TA 1535 a

— *S. typhimurium* TA 1537 alebo TA 97, alebo TA 97a a

— *S. typhimurium* TA 98 a

— *S. typhimurium* TA 100 a

— *E. coli* WP2 uvrA alebo *E. coli* WP2 uvrA (pKM101), alebo *S. typhimurium* TA 102.

Na zistenie spájacích mutagénov je vhodnejšie použiť TA 102 alebo pridať kmeň *E. coli* [napríklad *E. coli* WP2 alebo *E. coli* WP2 (pKMIOl)], ktorý dokonale opravuje DNA.

▼B

Na prípravu kultúr, overovanie bunkových znakov a uskladnenie sa používajú overené postupy. Požiadavka na aminokyselinu pre rast sa preukazuje pre každý prípravok zmrznutej kultúry (histidín pre kmene *S. typhimurium* a tryptofán pre kmene *E. coli*). Podobným spôsobom sa overujú iné fenotypové charakteristiky, menovite ak je potrebná prítomnosť alebo neprítomnosť R-faktorových plazmidov [napríklad odolnosť proti ampicilínu v kmeňoch TA 98, TA 100 a TA 97a alebo TA 97, WP2 uvrA alebo WP2 uvrA (pKM101) a odolnosť proti ampicilínu a tetracyklínu v kmeni TA102]; prítomnosť charakteristických mutácií (t. j. rfa mutácia *S. typhimurium* prostredníctvom citlivosti na kryštálovo fialovú a uvrA mutáciu *E. coli* alebo uvrB mutáciu *S. typhimurium* prostredníctvom citlivosti na ultrafialové svetlo) (2) (3). Kmene by tiež mali dosahovať spontánne počty revertantných kolónií v rámci frekvenčných rozsahov očakávaných podľa historických kontrolných údajov laboratória, najlepšie v rozsahu uvedenom v literatúre.

1.5.1.2. *Médium*

Používa sa vhodné minimálne množstvo agaru (napríklad obsahujúci Vogelovo-Bonnerovo minimálne médium E a glukózu) a krycí agar obsahujúci histidín a biotín alebo tryptofán umožňujúci malý počet delení buniek (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Metabolická aktivácia*

Baktérie sa vystavia testovacej látke v prítomnosti i v neprítomnosti vhodného systému metabolickej aktivácie. Najpoužívanejším systémom je postmitochondriálna frakcia podporená kofaktorom (S9), pripravená z pečene hlodavcov ošetrených prípravkami na indukciu enzýmov, ako napríklad Aroclorom 1254 (1) (2) alebo kombináciou fenobarbitonu a betanaftoflavónu (18) (20) (21). Postmitochondriálna frakcia sa zvyčajne používa v koncentrácii v rozsahu od 5 % do 30 % v/v v zmesi S9. Výber a stav systému metabolickej aktivácie môže závisieť od triedy testovanej chemikálie. V niektorých prípadoch je vhodné využiť viac než jednu koncentráciu postmitochondriálnej frakcie. Pre azofarbivá a diazozmesi je vhodnejšie použiť redukčný systém metabolickej aktivácie (6) (13).

1.5.1.4. *Testovacia látka/prípravok*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú alebo ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je to potrebné, rozrieďujú sa pred podávaním baktériám. Kvapalné testovacie látky sa podávajú priamo alebo rozriedené pred podávaním. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na vhodnosť uskladnenia.

Rozpúšťadlo/nosič by nemali chemicky reagovať s testovacou látkou a mali by byť kompatibilné s prežitím buniek a aktivitou S9 (22). Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by mali podporiť údaje označujúce ich kompatibilitu. Odporúča sa zvážiť, ak je to možné, použitie vodného rozpúšťadla/nosiča. Pri testovaní vo vode nestabilných látok by organické rozpúšťadla nemali obsahovať vodu.

▼B

1.5.2. **Podmienky testov**

1.5.2.1. *Testovacie kmene (pozri 1.5.1.1)*

1.5.2.2. *Koncentrácie dávok*

Medzi kritériá, ktoré je potrebné brať do úvahy pri stanovovaní najvyššieho množstva použitej testovacej látky, patrí cytotoxicita a rozpustnosť v konečnej zmesi.

Je užitočné stanoviť toxicitu a nerozpustnosť pri predbežnom pokuse. Cytotoxicita sa dá zistiť redukciou v množstve revertantných kolónií, vyjasnením alebo redukciou pozadia, alebo stupňom prežitia ošetrených kultúr. Cytotoxicita látky sa môže meniť v prítomnosti systémov metabolickej aktivácie. Nerozpustnosť by sa mala určiť ako vyzrážanie v konečnej zmesi za skutočných podmienok testu a musí byť viditeľná voľným okom.

Odporúčaná maximálna testovacia koncentrácia rozpustných necytotoxických látok je 5 mg/miska alebo 5 µl/miska. V prípade necytotoxických látok, ktoré nie sú rozpustné pri 5 mg/miska alebo 5 µl/miska, má byť v konečnej zmesi nerozpustná jedna alebo viac testovaných koncentrácií. Testované látky, ktoré sú cytotoxické už pod 5 mg/miska alebo 5 µl/miska, sa majú testovať až po cytotoxickú koncentráciu. Zrazenina by nemala prekážať vyhodnoteniu.

Malo by sa použiť aspoň päť rôznych analyzovateľných koncentrácií testovanej látky s intervalmi približne pol log (t. j. √10) medzi testovanými miestami v počiatočnom experimente. Menšie intervaly môžu byť vhodné vtedy, ak sa skúma vzťah koncentrácia/reakcia. Možno zvážiť testovanie nad koncentráciu 5 mg/miska alebo 5 µl/miska, ak sa vyhodnocujú látky obsahujúce významné množstvá potenciálne mutagénnych nečistôt.

1.5.2.3. *Negatívne a pozitívne kontroly*

Pri každej skúške sa zahrnú súbežne podľa kmeňa špecifické pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo alebo nosič) kontrolné kultúry, a to s metabolickou aktiváciou i bez nej. Koncentrácie pri pozitívnych kontrolných kultúrach sa volia tak, aby pri každej skúške vykazovali efektívny výkon.

Pri pokusoch s použitím systému metabolickej aktivácie sa referenčné látky pozitívnej kontrolnej kultúry vyberajú na báze použitého typu bakteriálnych kmeňov.

Nasledujúce látky sú príkladmi látok vhodných pre pozitívne kontrolné kultúry pri pokusoch s metabolickou aktiváciou.

Číslo CAS	Číslo EINECS	Látka
781-43-1	212-308-4	9,10-dimetylantracén
57-97-6	200-359-5	7,12-dimetylbenz[a]anthracén
50-32-8	200-028-5	benzo[a]pyrén
613-13-8	210-330-9	2-aminoantracén

▼B

Číslo CAS	Číslo EINECS	Látka
50-18-0		cyklofosfamid
6055-19-2	200-015-4	cyklofosfamid monohydrát

Nasledujúca látka je vhodná pre pozitívne kontrolné kultúry pri metóde redukčnej metabolickej aktivácie:

Číslo CAS	Číslo EINECS	Látka
573-58-0	209-358-4	Congo Red (červeň Congo)

2-aminoantracén by nemal byť jediným indikátorom efektívnosti zmesi S9. Ak sa používa 2-aminoantracén, každá dávka S9 by tiež mala byť charakterizovaná mutagénom, ktorý vyžaduje metabolickú aktiváciu mikrozomálnymi enzýmami, napríklad benzo[a]pyrén, dimetylbenzantracén.

Nasledujúce látky sú príkladmi pozitívnych kontrolných kultúr podľa kmeňov pre skúšky bez exogénneho systému metabolickej aktivácie:

Číslo CAS	Číslo EINECS	Látka	Kmeň
26628-22-8	247-852-1	azid sodný	TA 1535 a TA 100
607-57-8	210-138-5	2-nitrofluorén	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-aminoakridín	TA 1537, TA 97 a TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 a TA 97a
80-15-9	201-254-7	kumén hydroperoxid	TA 102
50-07-7	200-008-6	mitomycín C	WP2 uvrA a TA 102
70-25-7	200-730-1	N-etyl-N-nitro-N-nitrozguanidín	WP2, WP2uvrA a WP2uvrA(pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-nitrochinolín-1-oxid	WP2, WP2uvrA a WP2uvrA(pKM101)
3688-53-7		furylfuramid (AF2)	kmene obsahujúce plazmid

Pre pozitívne kontrolné kultúry sa môžu použiť aj ďalšie vhodné referenčné látky. Podľa dostupnosti sa zváži použitie chemikálií príbuzných triede chemikálií pre pozitívnu kontrolnú skupinu.

Použijú sa tiež negatívne kontrolné vzorky pozostávajúce len z rozpúšťadla alebo nosiča, bez testovacej látky a inak ošetrované rovnakým spôsobom ako pokusné skupiny. Používajú sa aj neošetrené kontrolné vzorky, pokiaľ neexistujú historické kontrolné údaje demonštrujúce, že vybrané rozpúšťadlo nespôsobuje žiadne škodlivé alebo mutagénne účinky.

▼B

1.5.3. **Postup**

Pri metóde s použitím misiek (1) (2) (3) (4) bez metabolickej aktivácie sa zvyčajne zmieša 0,05 ml alebo 0,1 ml testovacích roztokov, 0,1 ml čerstvej bakteriálnej kultúry (obsahujúcej približne 10^8 životaschopných buniek) a 0,5 ml sterilného tlmiaceho roztoku s 2,0 ml krycieho agaru. Pri skúške s metabolickou aktiváciou sa zvyčajne zmieša 0,5 ml roztoku metabolickej aktivácie obsahujúceho vhodné množstvo postmitochondriálnej frakcie (v rozmedzí od 5 % do 30 % v/v v roztoku na metabolickú aktiváciu) s krycím agarom (2,0 ml), s baktériami a testovacou látkou/testovacím roztokom. Obsah oboch skúmaviek sa zmieša a vyleje sa na povrch veľmi malej agarovej misky. Krycí agar sa pred inkubáciou nechá vytvrdnúť.

Pri predinkubačnej metóde (2) (3) (5) (6) sa testovacia látka/testovací roztok predinkubuje s testovacím kmeňom (obsahujúcim približne 10^8 životaschopných buniek) a sterilným tlmiacim roztokom alebo systémom metabolickej aktivácie (0,5 ml) zvyčajne na 20 minút alebo viac pri teplote 30 °C – 37 °C pred zmiešaním s krycím agarom a vyliatím na povrch veľmi malej agarovej misky. Zvyčajne sa mieša 0,05 alebo 0,1 ml testovacej látky/testovacieho roztoku, 0,1 ml baktérií a 0,5 ml zmesi S9 alebo sterilného tlmiaceho roztoku s 2,0 ml krycieho agaru. Skúmavky sa počas predinkubácie vetrajú použitím miešadla.

Pri každej úrovni dávok sa kvôli primeranému odhadu variácie používajú tri misky. Použitie dvoch misiek je prijateľné s vedeckým zdôvodnením. Občasná strata misky pokus neznehodnocuje.

Plynné alebo prchavé látky sa testujú vhodnými metódami, ako napríklad vo vzduchotesne uzatvorených nádobách (12) (14) (15) (16).

1.5.4. **Inkubácia**

V danom pokuse sa misky inkubujú pri teplote 37 °C počas 48 – 72 hodín. Po uplynutí inkubačnej doby sa zráta počet revertantných kolónií na misku.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje sa uvádzajú ako počet revertantných kolónií na misku. Udáva sa tiež počet revertantných kolónií pri negatívnych (kontrola rozpúšťadlom a bez ošetrenia, ak sa použili) a pozitívnych kontrolných kultúrach. Jednotlivé počty na miskách, stredná hodnota revertantných kolónií na misku a štandardná odchýlka sa uvádzajú pre testovaciu látku aj pre pozitívne a negatívne kontrolné kultúry (bez ošetrenia a/alebo s rozpúšťadlom).

Neexistuje požiadavka na potvrdenie jasných pozitívnych reakcií. Nejasné výsledky sa objasňujú ďalším testovaním, najlepšie použitím modifikácie pokusných podmienok. Negatívne výsledky sa musia potvrdiť od prípadu k prípadu. V prípadoch, keď sa potvrdenie negatívnych výsledkov nepovažuje za potrebné, sa poskytne zdôvodnenie. Modifikácia parametrov štúdie na rozšírenie rozsahu hodnotených podmienok sa posudzuje pri následných pokusoch. Parametre štúdie, ktoré sa dajú modifikovať, zahŕňajú rozsahy koncentrácií, metódu aplikácie látky (použitie misky alebo kvapalná predinkubácia) a podmienky metabolickej aktivácie.

▼B

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Pre stanovenie pozitívneho výsledku existuje niekoľko kritérií, ako napríklad nárast oproti testovanému rozsahu spojený s koncentráciou a/alebo reprodukovateľný nárast pri jednej alebo viacerých koncentráciách počtu revertantných kolónií na misku najmenej v jednom kmeni so systémom metabolickej aktivácie alebo bez systému metabolickej aktivácie (23). Najprv sa zvažuje biologická relevantnosť výsledkov. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy (24). Štatistická významnosť však nie je jediným určujúcim faktorom pozitívnej reakcie.

Testovacia látka, pre ktorú nespĺňajú výsledky vyššie uvedené kritériá, sa pre tento test považuje za nemutagénnu.

Hoci väčšina pokusov poskytne jasne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch súbor údajov vopred vylúči jednoznačné posúdenie aktivity testovacej látky. Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybniteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

Pozitívne výsledky bakteriálneho testu reverzných mutácií naznačujú, že určitá látka vyvoláva bodové mutácie prostredníctvom základných substitúcií alebo konštrukčných posunov genómu *Salmonella typhimurium* a/alebo *Escherichia coli.* Negatívne výsledky naznačujú, že testovacia látka nie je v testovacích podmienkach pre testované druhy mutagénna.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu zahŕňa nasledujúce informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

— zdôvodnenie výberu nosiča,

— rozpustnosť a stálosť testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Kmene:

— použité kmene,

— počet buniek v kultúre,

— charakteristiky kmeňa.

Podmienky testov:

— množstvo testovacej látky na misku (mg/miska alebo µl/miska) so zdôvodnením voľby dávky a počtu misiek na koncentráciu,

— použité médiá,

— typ a zloženie systému metabolickej aktivácie vrátane kritérií prijateľnosti,

— postupy dávkovania.

Výsledky:

— známky toxicity,

— známky zrážania,

— počty na jednotlivých miskách,

▼B

— stredná hodnota revertantných kolónií na misku a štandardná odchýlka,

— vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je to možné,

— štatistické analýzy, ak sa uskutočnili,

— súbežné údaje o negatívnych (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnych kontrolných kultúrach s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami,

— historické údaje o negatívnych (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnych kontrolných kultúrach s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami.

Rozbor výsledkov.

Závery.

4. **ODKAZY**

(1) Ames, B. N., McCann, J. a Yamasaki, E. (1975) Methods of Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res., 31, s. 347 – 364.

(2) Maron, D. M. a Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Res., 113, s. 173 – 215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C, Nohmi, T., Venitt, S. a Zeiger, E. (1994) Recommendations for the Perfomance of Bacterial Mutation Assays, Mutation Res., 312, s. 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., Príval, M., Rao, T. K. a Ray, V. (1986), The Salmonella typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 168, s. 69 – 240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y. Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. a Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, Cancer letters 1, s. 91 – 96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. a Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Test, in: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens, ed. Norpoth, K. H. a Garner, R C, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, s. 273 – 285.

(7) Gatehouse, D. G, Rowland, I. R, Wilcox, P., Callender, R D. a Foster, R (1980), Bacterial Mutation Assays, in: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised, ed. D. J. Kirkland, Cmabridge University Press, s. 13 – 61.

(8) Aeschacher, H. U, Wolleb, U. a Porchet, L. (1987), Liquid Mutagenicity Test for Foods, J. Food Safety, 8, s. 167 – 177.

(9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. a Bridges, B. A. (1976), Use of a Simplified Fluctuation Test to Detect Low Levels of Mutagens, Mutation Res., 38, s. 33 – 42.

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. a Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2. vydanie, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. a Ramel, C, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, s. 141 – 161.

▼B

(11) Thomson, E. D. a Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*, Environmental Mutagenesis, 3, s. 453 – 465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. a Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, Mutation Res., 307, s. 335 – 344.

(13) Príval, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D a Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, Mutation Res., 136, s. 33 – 47.

(14) Zeiger, E., Anderson, B. E., Haworth, S., Lawlor, T. a Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals (Testy mutagénnosti samonelly, výsledky testovania 311 chemikálií), Environ. Mol. Mutagen., 19, s. 2 – 141.

(15) Simmon, V., Kauhanen, K. a Tardiff, R. G (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in: Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges a F. Soebels (eds), Elsevier, Amsterdam, s. 249 – 258.

(16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. a Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, Environmental Mutagenesis, 9, s. 421 – 441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. a Sugimura, T. (1979) Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cyasin and Synthetic Metylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*, Cancer Res., 39, s. 3780 – 3782.

(18) Tamura, G, Gold, C, Ferro-Luzzi, A. a Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, s. 4961 – 4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J., a Gatehouse, D. G (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia Coli* WP2 Tester Strains, Mutagenesis, 5, s. 285 – 291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. a Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyl as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis testing, de Serres a kol. (eds), Elsevier, North Holland, s. 85 – 88.

(21) Elliot, B. M., Combes, R D. Elcombe, C. R, Gatehouse, D. G, Gibson, G. G, Mackay, J. M. a Wolf, R. C. (1992), Alternative to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, s. 175 – 177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. a Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, Mutation Res., 88, s. 343 – 350.

(23) Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K, Nestmann, E. a Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium/Mammalian* Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, Mutation Res., 189, s. 83 – 91.

▼B

(24) Mahon, G A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchel, I., Robinson, W. D. a Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part II, Statistical Evaluation of Mutagenicity test Data, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, Cambridge, s. 28 – 65.

▼M7

_____

_____

▼M8

B.17. *IN VITRO* TESTY NA GÉNOVÉ MUTÁCIE CICAVČÍCH BUNIEK S VYUŽITÍM GÉNOV HPRT A XPRT

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda (TM) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov 476 (2016). Testovacie metódy sa pravidelne revidujú vzhľadom na vedecký pokrok, zmeny regulačných potrieb a dobré životné podmienky zvierat. Táto súčasná revidovaná verzia TM B.17 zohľadňuje takmer tridsaťročné skúsenosti s týmto testom, ako aj výsledky z vývoja samostatnej novej metódy zameranej na *in vitro* testy na génové mutácie cicavčích buniek s využitím génu tymidínkinázy. TM B.17 je súčasťou série testovacích metód v oblasti genetickej toxikológie. Bol vypracovaný dokument OECD, ktorý obsahuje stručné informácie o testovaní v oblasti genetickej toxikológie a prehľad posledných zmien, ktoré sa vykonali v usmerneniach OECD na vykonávanie testov v oblasti genetickej toxicity (1).

2. *In vitro* test na génové mutácie cicavčích buniek sa používa na zistenie génových mutácií vyvolaných chemikáliami. V bunkových líniách, ktoré sa používajú v týchto testoch, sa merajú priame mutácie v reportérových génoch, konkrétne v endogénnom géne hypoxantín-guanín-fosforibozyltransferázy (Hprt v bunkách hlodavcov, HPRT v ľudských bunkách; v tejto testovacej metóde spoločne označované ako gén Hprt a test HPRT) a prenesenom géne xantín-guanín-fosforibozyltransferázy (gpt) (označovaný ako test XPRT). Testmi mutácií HPRT a XPRT sa zisťuje rôzne spektrum genetických udalostí. Okrem mutačných udalostí zisťovaných testom HPRT (napr. bázové zámeny, posuny čítacieho rámca, malé delécie a včlenenia) možno pomocou autozomálnej lokalizácie preneseného génu gpt zistiť mutácie v dôsledku veľkých delécií a prípadne mitotickej rekombinácie, ktorá sa nezistila prostredníctvom testu HPRT, pretože gén Hprt sa nachádza v X-chromozóme (2) (3) (4) (5) (6) (7). Pokiaľ ide o regulačné účely, test XPRT sa v súčasnosti využíva menej často než test HPRT.

3. Vymedzenie použitých pojmov sa uvádza v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

4. Testy vykonávané *in vitro* si vo všeobecnosti vyžadujú použitie exogénneho zdroja metabolickej aktivácie. Exogénny systém metabolickej aktivácie nenapodobňuje v plnej miere podmienky *in vivo*.

5. Je potrebné dbať na to, aby sa predišlo podmienkam, ktoré by viedli k falošným pozitívnym výsledkom (t. j. možnej interakcii so systémom testovania), ktoré by neboli spôsobené priamou interakciou medzi testovanými chemikáliami a genetickým materiálom bunky, pričom medzi takéto podmienky patria zmeny pH alebo osmolality (8) (9) (10), interakcia so zložkami média (11) (12) alebo nadmerné úrovne cytotoxicity (13). Cytotoxicita, ktorá prekračuje odporúčané horné hranice cytotoxicity uvedené v odseku 19, sa na účely testu HPRT považuje za nadmernú.

▼**M8**

6. Pred použitím tejto testovacej metódy na zmesi s cieľom generovať údaje plánované na regulačné účely by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na tento účel, a ak áno, tak prečo. Takéto úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi.

PRINCÍP TESTU

7. Mutantné bunky s nedostatočnou enzymatickou aktivitou Hprt v teste HPRT alebo enzymatickou aktivitou xprt v teste XPRT sú rezistentné voči cytostatickým účinkom purínového analógu 6-tioguanínu (TG). Bunky s dostatkom Hprt (v teste HPRT) alebo gpt (v teste XPRT) sú citlivé na TG, čo spôsobuje inhibíciu bunkového metabolizmu a zastavuje ďalšie delenie buniek. Mutantné bunky sú tak schopné rozširovať sa za prítomnosti TG, zatiaľ čo normálne bunky, ktoré obsahujú Hprt (v teste HPRT) alebo gpt (v teste XPRT), toho schopné nie sú.

8. Bunky v suspenzii alebo jednovrstvových kultúrach sa vystavia testovanej chemikálii s exogénnym zdrojom metabolickej aktivácie i bez takéhoto zdroja (pozri odsek 14) na primeraný čas (3 – 6 hodín) a následne sa subkultivujú na stanovenie cytotoxicity a na umožnenie fenotypového prejavu pred mutantnou selekciou (14) (15) (16) (17). Cytotoxicita sa určuje na základe relatívneho prežitia (RS), t. j. klonovacej účinnosti meranej bezprostredne po ošetrení pri zohľadnení všetkých strát buniek počas ošetrenia v porovnaní s negatívnou kontrolou (odsek 18 a dodatok 2). Ošetrené kultúry sa dostatočné obdobie, charakteristické pre každý typ buniek, udržiavajú v médiu, čo umožní takmer optimálny fenotypový prejav indukovaných mutácií (zvyčajne minimálne 7 – 9 dní). Po fenotypovom prejave sa frekvencia mutácií stanovuje zasadením známeho počtu buniek do média obsahujúceho selektívne činidlo na zistenie mutantných kolónií a do média bez selektívneho činidla na stanovenie klonovacej účinnosti (životaschopnosti). Po vhodnom inkubačnom čase sa kolónie zrátajú. Frekvencia mutácií sa vypočíta na základe počtu mutantných kolónií s korekciou podľa klonovacej účinnosti v čase mutantnej selekcie.

OPIS METÓDY

Príprava

Bunky

9. Typy buniek použité na testy HPRT a XPRT majú mať preukázanú citlivosť na chemické mutagény, vysokú klonovaciu účinnosť, stabilný karyotyp a stabilnú frekvenciu spontánnych mutácií. Medzi najčastejšie používané bunky v teste HPRT patria línie CHO, CHL a V79 buniek škrečkov čínskych, lymfómové bunky myší L5178Y a TK6 ľudské lymfoblastoidné bunky (18) (19). Bunky AS52 odvodené od CHO, ktoré obsahujú prenesený gén gpt (a majú deletovaný gén Hprt), sa používajú pre test XPRT (20) (21); test HPRT nemožno uskutočniť na bunkách AS52 v dôsledku delécie génu hprt. Použitie iných bunkových línií má byť opodstatnené a validované.

10. Bunkové línie by sa mali pravidelne kontrolovať, pokiaľ ide o stabilitu modálneho počtu chromozómov a o vylúčenie kontaminácie mykoplazmou (22) (23), a v prípade kontaminácie alebo zmeny modálneho počtu chromozómov by sa nemali použiť. Mala by sa stanoviť dĺžka bežného bunkového

▼M8

cyklu pri použití v skúšobnom laboratóriu, ktorá by mala byť v súlade s bunkovými charakteristikami uvedenými v literatúre. Je potrebné skontrolovať aj frekvenciu spontánnych mutácií v zásobe materských buniek a nepoužívať zásobu v prípade neprijateľnej frekvencie mutácií.

11. Pred použitím v tomto teste sa kultúry podľa potreby prečistia od existujúcich mutantných buniek, napr. kultiváciou v médiu HAT pre test HPRT a v médiu MPA pre test XPRT (5) (24) (pozri dodatok 1). Prečistené bunky možno kryogénne zakonzervovať a následne rozmraziť, aby ich bolo možné používať ako pracovné zásoby. Nanovo rozmrazenú pracovnú zásobu možno používať na účely testu, keď sa dosiahnu normálne časy zdvojenia. Pri vykonávaní testu XPRT sa pre rutinnú kultúru buniek AS52 používajú podmienky, ktoré zabezpečujú udržiavanie preneseného génu gpt (20).

Médiá a podmienky kultivácie

12. Na udržiavanie kultúr by sa malo použiť vhodné kultivačné médium a inkubačné podmienky (kultivačné nádoby, atmosféra s vyššou relatívnou vlhkosťou a 5 % CO2, inkubačná teplota 37 °C). Bunkové kultúry sa majú vždy udržiavať v podmienkach, v ktorých je zabezpečené, že ich rast prebieha v logaritmickej fáze. Osobitne dôležité je zvoliť médium a podmienky kultivácie tak, aby bol zabezpečený optimálny rast buniek počas doby expresie a optimálna klonovacia účinnosť mutantných aj nemutantných buniek.

Príprava kultúr

13. Bunkové línie sa rozmnožujú zo zásobných kultúr, nasadia sa do kultivačného média v takej hustote, aby pri bunkách v suspenziách alebo v jednovrstvových bunkových kultúrach pokračoval exponenciálny rast počas času ošetrenia a doby expresie (napr. malo by sa zabrániť zhlukovaniu v prípade buniek rastúcich v jednovrstvových bunkových kultúrach).

Metabolická aktivácia

14. Ak sa použijú bunky s nedostatočnou endogénnou metabolickou kapacitou, mali by sa použiť exogénne systémy metabolickej aktivácie. Najpoužívanejším systémom, ktorý sa štandardne odporúča, pokiaľ to nie je odôvodnené inak, je kofaktormi obohatená postmitochondriálna frakcia (S9) pripravená z pečene hlodavcov (väčšinou potkanov) ošetrená činidlami na indukciu enzýmov, ako je napríklad Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) alebo kombinácia fenobarbitalu a β-naftoflavónu (29) (30) (31) (32). Použitie uvedenej kombinácie nie je v rozpore so Štokholmským dohovorom o perzistentných organických látkach (33) a preukázalo sa, že táto kombinácia je rovnako účinná pri indukcii oxidáz so zmiešanou funkciou ako Aroclor 1254 (29) (31). Frakcia S9 sa v konečnom testovacom médiu zvyčajne používa v koncentráciách od 1 obj. % do 2 obj. %, môže sa však zvýšiť až na 10 obj. %. Výber typu a koncentrácie použitého exogénneho systému metabolickej aktivácie alebo metabolického induktora môže ovplyvniť trieda testovaných látok (34) (35) (36).

Príprava testovanej chemikálie

15. Testované chemikálie v tuhom skupenstve by sa podľa potreby mali rozpustiť vo vhodnom rozpúšťadle pred ich aplikáciou na bunky (pozri odsek 16). Kvapalné testované chemikálie možno pridať priamo do testovacieho systému a/alebo pred aplikáciou na testovací systém rozriediť. Plynné alebo prchavé testované chemikálie by sa mali testovať tak, že sa štandardné protokoly vhodne upravia, napríklad sa v nich uskutoční aplikácia v uzavretých kultivačných nádobách (37) (38). Prípravky testovanej chemikálie by sa mali pripraviť bezprostredne pred aplikáciou, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na prijateľnosť uskladnenia.

▼M8

PODMIENKY TESTOVANIA

Rozpúšťadlá

16. Rozpúšťadlo by sa malo zvoliť tak, aby sa optimalizovala rozpustnosť testovaných chemikálií bez toho, aby rozpúšťadlo malo negatívny vplyv na vykonávanie testu (napr. zmenou rastu buniek), ovplyvňovalo integritu testovanej chemikálie, reagovalo s kultivačnými nádobami a narušovalo systém metabolickej aktivácie. Odporúča sa, pokiaľ je to možné, najskôr zvážiť použitie vodného rozpúšťadla (alebo kultivačného média). Medzi osvedčené rozpúšťadlá patrí napr. voda a dimetylsulfoxid. Organické rozpúšťadlá by vo všeobecnosti nemali presiahnuť 1 obj. % a vodné rozpúšťadlá (fyziologický roztok alebo voda) by nemali presiahnuť 10 obj. % v konečnom médiu s testovanou chemikáliou. Ak sa použijú iné ako osvedčené rozpúšťadlá (napr. etanol alebo acetón), ich použitie by malo byť podložené údajmi o ich kompatibilite s testovanou chemikáliou a testovacím systémom a o tom, že v použitej koncentrácii nie sú genotoxické. V prípade, že tieto podkladové údaje nie sú k dispozícii, je dôležité do testu doplniť neošetrené kontroly (pozri dodatok 1) s cieľom preukázať, že zvolené rozpúšťadlo nevyvoláva žiadne nepriaznivé ani mutagénne účinky.

Meranie cytotoxicity a výber expozičných koncentrácií

17. Pri stanovovaní najvyššej koncentrácie testovanej chemikálie by sa malo zabrániť použitiu koncentrácií, ktoré majú schopnosť vyvolať falošné pozitívne reakcie, napr. koncentrácií vyvolávajúcich nadmernú cytotoxicitu (pozri odsek 20), zrážanie kultivačného média (pozri odsek 21) alebo výrazné zmeny pH alebo osmolality (pozri odsek 5). Ak testovaná chemikália v čase, keď sa pridáva, spôsobuje výraznú zmenu pH média, mohlo by sa pH upraviť aplikovaním tlmivého roztoku do konečného média s testovanou chemikáliou tak, aby nedošlo k falošným pozitívnym výsledkom a aby sa zachovali vhodné kultivačné podmienky.

18. Koncentrácia sa určuje na základe cytotoxicity a iných faktorov (pozri odseky 20 – 22). Aj keď z hľadiska lepšieho definovania koncentrácií, ktoré sa majú použiť v hlavnom experimente, môže byť užitočné hodnotenie cytotoxicity v počiatočnom teste, počiatočný test nie je povinný. Aj keď sa vykoná počiatočné hodnotenie cytotoxicity, vyžaduje sa aj meranie cytotoxicity jednotlivých kultúr v hlavnom experimente. Cytotoxicita sa hodnotí na základe relatívneho prežitia (RS), t. j. klonovacej účinnosti (CE) buniek naočkovaných bezprostredne po ošetrení pri zohľadnení všetkých strát buniek počas ošetrenia, a to na základe počtu buniek v porovnaní s upravenou klonovacou účinnosťou negatívnych kontrol (ktorým je priradená miera prežitia 100 %) (pozri vzorec v dodatku 2).

19. Mali by sa vyhodnotiť aspoň štyri testovacie koncentrácie (bez rozpúšťadla a pozitívnych kontrol), ktoré spĺňajú kritériá prijateľnosti (vhodná cytotoxicita, počet buniek atď.). Hoci sa odporúča použitie duplicitných kultúr, pri každej testovanej koncentrácii sa môžu použiť buď paralelné kultúry, alebo jednotlivé ošetrené kultúry. Výsledky získané z nezávislých paralelných kultúr pri danej koncentrácii sa majú uvádzať samostatne, možno ich však zlúčiť na účely analýzy údajov (17). V prípade testovaných chemikálií, ktoré vykazujú malú alebo nevykazujú žiadnu cytotoxicitu, budú za bežných okolností vhodné približne dvojnásobné až trojnásobné intervaly koncentrácií. Pri výskyte cytotoxicity by vybrané testované koncentrácie mali pokrývať rozsah od koncentrácie, ktorá vyvoláva cytotoxicitu, po koncentrácie, pri ktorých je cytotoxicita mierna a slabá alebo žiadna. Mnohé testované chemikálie vykazujú strmé krivky závislosti reakcie od koncentrácie a s cieľom pokryť celý

▼M8

rozsah cytotoxicity alebo podrobne preskúmať vzťah medzi koncentráciou a reakciou môže byť nevyhnutné použiť viac koncentrácií s tesným odstupom a viac ako štyri koncentrácie, najmä v situáciách, keď sa vyžaduje opakovať experiment (pozri odsek 43). Použitie viac ako štyroch koncentrácií môže byť obzvlášť dôležité pri použití jednotlivých kultúr.

20. Ak maximálna koncentrácia vychádza z cytotoxicity, cieľová najvyššia koncentrácia by mala mať hodnotu relatívneho prežitia v rozsahu 20 až 10 %. Pri interpretácii pozitívnych výsledkov, ktoré sa zistili len pri hodnote relatívneho prežitia 10 % alebo nižšej, je potrebné postupovať obozretne (odsek 43).

21. V prípade slabo rozpustných testovaných chemikálií, ktoré nie sú cytotoxické pri koncentráciách nižších, než je najnižšia nerozpustná koncentrácia, by najvyššia analyzovaná koncentrácia mala na konci ošetrenia testovanou chemikáliou vyvolať zakalenie alebo zrazeninu viditeľnú voľným okom alebo pomocou inverzného mikroskopu. Aj keď sa cytotoxicita vyskytne pri koncentrácii vyššej, ako je najnižšia nerozpustná koncentrácia, testovať sa odporúča len pri jednej koncentrácii vyvolávajúcej zakalenie alebo viditeľnú zrazeninu, pretože falošné účinky môžu byť spôsobené zrazeninou. Pri koncentrácii vyvolávajúcej zrazeninu je potrebné zabezpečiť, aby táto zrazenina nenarušovala vykonávanie testu. Môže byť užitočné pred experimentom stanoviť rozpustnosť v kultivačnom médiu.

22. Ak sa nezistí žiadna zrazenina ani obmedzujúca cytotoxicita, najvyššia testovaná koncentrácia by mala zodpovedať 10 mM, 2 mg/ml alebo 2 µl/ml, podľa toho, ktorá je najnižšia (39) (40). Keď testovaná chemikália nemá určené zloženie, napr. látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály [t. j. chemické látky neznámeho alebo variabilného zloženia (UVCB)] (41), extrakty z prostredia atď., môže byť potrebná vyššia maximálna koncentrácia (napr. 5 mg/mL) v prípade absencie dostatočnej cytotoxicity, aby sa zvýšila koncentrácia jednotlivých zložiek. Je však potrebné poznamenať, že tieto požiadavky sa môžu v prípade humánnych liekov líšiť (42).

Kontroly

23. Pre všetky experimentálne podmienky by sa mali zahrnúť súbežné negatívne kontroly (pozri odsek 16), ktoré pozostávajú zo samotného rozpúšťadla v médiu s testovanou chemikáliou a s ktorými sa manipuluje rovnakým spôsobom ako s ošetrenými kultúrami.

24. Súbežné pozitívne kontroly sú potrebné na preukázanie schopnosti laboratória identifikovať mutagény v podmienkach použitého testovacieho protokolu a v prípade potreby aj na preukázanie účinnosti exogénneho systému metabolickej aktivácie. Príklady pozitívnych kontrol sú uvedené v tabuľke 1 ďalej. V odôvodnených prípadoch sa môžu na pozitívnu kontrolu použiť alternatívne látky. Keďže testy na cicavčích bunkách *in vitro* na zistenie genetickej toxicity sú dostatočne štandardizované, možno testy využívajúce ošetrenia s exogenóznou metabolickou aktiváciou a bez takejto aktivácie uskutočniť len pomocou pozitívnej kontroly vyžadujúcej metabolickú aktiváciu. V tomto prípade reakcia na túto jednu pozitívnu kontrolu preukáže činnosť systému metabolickej aktivácie, ako aj vnímavosť testovacieho systému. Každá pozitívna kontrola sa má použiť pri jednej alebo viacerých koncentráciách, pri ktorých sa očakáva reprodukovateľný a zistiteľný nárast voči pozadiu s cieľom preukázať citlivosť testovacieho systému, pričom reakciu by nemalo narušiť prekročenie limitov cytotoxicity, ktoré sú stanovené pre túto testovaciu metódu (pozri odsek 20).

▼M8

Tabuľka 1

Referenčné látky odporúčané na posúdenie spôsobilosti laboratória a na výber pozitívnych kontrol

Stav metabolickej aktivácie	Lokus	Látka a číslo CAS
neprítomnosťexogénnej metabolickej aktivácie	*Hprt*	etyl-metánsulfonát [č. CAS 62-50-0] N-etyl-N-nitrózomočovina [č. CAS 759-73-9] 4-nitrochinolín-1-oxid [č. CAS 56-57-5]
	xprt	streptonigrín [č. CAS 3930-19-6] mitomycín C [č. CAS 50-07-7]
prítomnosť exogénnej metabolickej aktivácie	*Hprt*	3-metylcholantrén [č. CAS 56-49-5] 7,12-dimetylbenzantracén [č. CAS 57-97-6] benzo[a]pyrén (č. CAS 50-32-8)
	xprt	benzo[a]pyrén (č. CAS 50-32-8)

POSTUP

Ošetrenie testovanou chemikáliou

25. Proliferujúce bunky sa ošetria testovanou chemikáliou za prítomnosti aj za neprítomnosti systému metabolickej aktivácie. Expozícia trvá primeraný čas (primeraný čas je zvyčajne 3 až 6 hodín).

26. Minimálny počet buniek použitých v každej z testovacích kultúr (kontrolnej aj ošetrenej) v každom štádiu testu je založený na frekvencii spontánnych mutácií. Všeobecným usmernením je ošetriť a subkultivovať dostatočný počet buniek na to, aby sa vo všetkých štádiách testu vo všetkých kultúrach zachovalo 10 spontánnych mutantov (17). Frekvencia spontánnych mutácií je vo všeobecnosti v rozsahu 5 až 20 × 10^{-6}. Na dosiahnutie frekvencie spontánnych mutácií 5 × 10^{-6} a zachovanie dostatočného počtu spontánnych mutantov (najmenej 10) aj pri kultúrach ošetrených pomocou koncentrácií, ktoré počas ošetrenia spôsobujú 90 % cytotoxicitu (10 % relatívne prežitie), by bolo potrebné ošetriť aspoň 20 × 106 buniek. Okrem toho sa počas doby expresie musí kultivovať a naočkovať na účely mutantnej selekcie dostatočný počet buniek (nikdy nie menej ako 2 milióny) (17).

Čas do prejavenia fenotypu a meranie frekvencie mutácií

27. Po období ošetrenia sa vykoná kultivácia buniek, aby sa mohol prejaviť mutantný fenotyp. Najmenej 7 až 9 dní je vo všeobecnosti dostatočných, aby bol možný takmer optimálny fenotypový prejav novoindukovaných mutantov Hprt a xprt (43) (44). Počas tohto času sa bunky pravidelne subkultivujú, aby sa zachoval ich exponenciálny rast. Po fenotypovom prejave sa bunky opätovne naočkujú do média so selektívnym činiteľom aj bez selektívneho činiteľa (6-tioguanín) na stanovenie počtu mutantov, resp. klonovacej účinnosti v čase selekcie. Na toto očkovanie možno použiť Petriho misky na jednovrstvové bunkové kultúry alebo mikrotitračné platničky pre bunky v suspenzii. Na účely mutantnej selekcie sa bunky naočkujú s takou hustotou, aby sa zabezpečila optimálna výťažnosť mutantov (t. j. aby sa predišlo metabolickému spolupôsobeniu) (17). Misky sa inkubujú primeraný čas na zabezpečenie optimálneho rastu kolónie (napr. 7 – 12 dní) a kolónie sa spočítajú. Frekvencia mutácií sa vypočíta na základe počtu mutantných kolónií s korekciou podľa klonovacej účinnosti v čase mutantnej selekcie (pozri vzorce v dodatku 2).

▼M8

Spôsobilosť laboratória

28. Na to, aby sa pred vykonaním rutinného testu zistilo, či má laboratórium s danou skúškou dostatočné skúsenosti, malo by mať vykonanú sériu pokusov s referenčnými pozitívnymi látkami pôsobiacimi prostredníctvom rôznych mechanizmov (aspoň jedna látka aktívna s metabolickou aktiváciou a jedna látka aktívna bez metabolickej aktivácie, vybraté z látok uvedených v tabuľke 1) a s rôznymi negatívnymi kontrolami (pri použití rôznych rozpúšťadiel/nosičov). Reakcie týchto pozitívnych a negatívnych kontrol by mali byť v súlade s príslušnou literatúrou. Tento postup sa nepoužije v prípade laboratórií, ktoré majú skúsenosti, t. j. ktoré majú k dispozícii databázu historických údajov, ako sa definuje v odsekoch 30 až 33.

29. Mal by sa preskúmať výber látok na pozitívnu kontrolu (pozri tabuľku 1 v odseku 25) za neprítomnosti aj za prítomnosti metabolickej aktivácie, aby sa preukázala spôsobilosť zistiť mutagénne chemikálie, stanoviť účinnosť systému metabolickej aktivácie a preukázať vhodnosť podmienok pre rast buniek počas ošetrovania, fenotypového prejavu a mutatnej selekcie, ako aj vhodnosť postupov hodnotenia. Rozsah koncentrácií vybraných látok by sa mal zvoliť tak, aby poskytol opakovateľné zvýšenia súvisiace s jednotlivými koncentráciami v porovnaní s úrovňou pozadia, aby sa tak preukázala citlivosť a dynamické rozpätie testovacieho systému.

Údaje o historických kontrolách

30. Laboratórium by malo určiť:

— rozsah a distribúciu historických pozitívnych kontrol,

— rozsah a distribúciu historických negatívnych kontrol (neošetrených, s rozpúšťadlom).

31. Pri prvom získavaní údajov súvisiacich s distribúciou historických negatívnych kontrol by súbežné negatívne kontroly mali byť v súlade s uverejnenými údajmi o kontrolách (22). S pridávaním ďalších experimentálnych údajov k distribúcii kontrol by súbežné negatívne kontroly mali byť v ideálnom prípade v rámci 95 % regulačných medzí tejto distribúcie (17) (45) (46).

32. Databázu historických negatívnych kontrol laboratória by na začiatku malo tvoriť minimálne 10 experimentov, ale podľa možnosti by mala pozostávať aspoň z 20 experimentov vykonaných za porovnateľných experimentálnych podmienok. Laboratóriá by mali použiť metódy kontroly kvality, ako sú regulačné diagramy [napr. tzv. „C-charts“ alebo „X-bar charts“ (47)], s cieľom zistiť variabilitu svojich údajov týkajúcich sa pozitívnych a negatívnych kontrol a preukázať, že metodika v danom laboratóriu je „pod kontrolou“ (46). Ďalšie odporúčania k vytváraniu a využívaniu historických údajov (t. j. kritériá zaradenia údajov medzi historické údaje a ich vylúčenia z historických údajov a kritériá prijateľnosti v prípade daného experimentu) možno nájsť v literatúre (45).

33. Údaje o negatívnych kontrolách majú obsahovať frekvencie mutácií z jednej alebo prednostne z paralelných kultúr podľa opisu v odseku 23. Súbežné negatívne kontroly by v ideálnom prípade mali byť v rámci 95 % regulačných medzí distribúcie databázy historických negatívnych kontrol laboratória (17) (45) (46). V prípade, že údaje o súbežných negatívnych kontrolách nepatria do 95 % regulačných medzí, môžu byť prijateľné na zaradenie do distribúcie historických kontrol, pokiaľ tieto údaje nie sú extrémne mimo uvedených medzí a pokiaľ existujú dôkazy o tom, že testovací systém je „pod kontrolou“ (pozri vyššie), a dôkazy o tom, že nedošlo k technickému alebo ľudskému zlyhaniu.

▼M8

34. Všetky zmeny v skúšobnom protokole by sa mali zvážiť z hľadiska ich súladu s existujúcimi databázami historických kontrol laboratória. Každý výrazný nesúlad by mal viesť k vytvoreniu novej databázy historických kontrol.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Prezentovanie výsledkov

35. Súčasťou prezentovania výsledkov majú byť všetky údaje potrebné na výpočet cytotoxicity (vyjadrenej ako relatívne prežitie). Tieto údaje, ktoré sa uvádzajú pre ošetrené aj kontrolné kultúry, obsahujú počet buniek na konci ošetrenia, počet buniek naočkovaných bezprostredne po ošetrení a počty kolónií (alebo počet jamiek bez kolónií v prípade mikrotitračnej metódy). Relatívne prežitie jednotlivých kultúr sa vyjadruje ako percentuálna hodnota vzhľadom na súbežnú kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla (pozri vymedzenie pojmov v dodatku 1).

36. Súčasťou prezentovania výsledkov majú byť aj všetky údaje potrebné na výpočet frekvencie mutácií. Údaje, ktoré sa uvádzajú pre ošetrené aj kontrolné kultúry, obsahujú: 1. počet buniek naočkovaných so selektívnym činiteľom a bez selektívneho činiteľa (v čase naočkovania buniek na účely mutantnej selekcie) a 2. počet spočítaných kolónií (alebo počet jamiek bez kolónií v prípade mikrotitračnej metódy) z misiek so selektívnym činiteľom a bez selektívneho činiteľa. Frekvencia mutácií sa vypočíta na základe počtu mutantných kolónií (v miskách so selektívnym činiteľom) s korekciou podľa klonovacej účinnosti (z misiek bez selektívneho činiteľa). Frekvencia mutácií sa vyjadruje ako počet mutantných buniek na milión životaschopných buniek (pozri vymedzenie pojmov v dodatku 1).

37. Mali by sa uvádzať údaje o jednotlivých kultúrach. Všetky údaje sa dodatočne sumarizujú v tabuľkovej forme.

Kritériá prijateľnosti

38. Prijateľnosť testu je založená na týchto kritériách:

— Súbežná negatívna kontrola sa považuje za prijateľnú na doplnenie do databázy historických negatívnych kontrol laboratória, ako je opísané v odseku 33.

— Súbežné pozitívne kontroly (pozri odsek 24) by mali vyvolať reakcie, ktoré sú zlučiteľné s reakciami generovanými v databáze historických pozitívnych kontrol, a viesť k štatisticky významnému nárastu v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou.

— Testovali sa dve experimentálne podmienky (t. j. s metabolickou aktiváciou a bez metabolickej aktivácie), pokiaľ jedna z nich neviedla k pozitívnym výsledkom (pozri odsek 25).

— Analyzovateľný je adekvátny počet buniek a koncentrácií (odseky 25, 26 a 19).

— Kritériá výberu najvyššej koncentrácie sú v súlade s kritériami opísanými v odsekoch 20, 21 a 22.

Hodnotenie a interpretácia výsledkov

39. Za predpokladu, že všetky kritériá prijateľnosti sú splnené, sa testovaná chemikália pokladá za jednoznačne pozitívnu, ak pre ktorúkoľvek z preskúmaných experimentálnych podmienok platí, že:

▼M8

— aspoň jedna z testovaných koncentrácií vykazuje štatisticky významné zvýšenie v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

— ide o nárast, pri ktorom sa pri hodnotení vhodným testovaním trendov potvrdí súvislosť s koncentráciou,

— niektorý z týchto výsledkov je mimo distribúcie údajov historických negatívnych kontrol (napr. mimo 95 % regulačných medzí Poissonovho rozdelenia, pozri odsek 33).

Ak sú splnené všetky tieto kritériá, testovaná chemikália sa považuje za schopnú vyvolať génové mutácie v kultivovaných bunkách cicavcov v tomto testovacom systéme. Odporúčania týkajúce sa najvhodnejších štatistických metód možno nájsť v literatúre (46) (48).

40. Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, testovaná chemikália sa pokladá za jednoznačne negatívnu, ak pre všetky preskúmané experimentálne podmienky platí, že:

— ani jedna z testovaných koncentrácií nevykazuje štatisticky významný nárast v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

— hodnotenie pomocou vhodného testovania trendov ukáže, že nedochádza k nárastu v závislosti od koncentrácie,

— všetky výsledky sa vyskytujú v rámci distribúcie historických údajov negatívnych kontrol (napr. v 95 % regulačných medziach Poissonovho rozdelenia, pozri odsek 33).

Testovaná chemikália sa vtedy považuje za neschopnú vyvolať génové mutácie v kultivovaných bunkách cicavcov v tomto testovacom systéme.

41. Neexistuje požiadavka na potvrdenie jednoznačne pozitívnej alebo negatívnej reakcie.

42. V prípade, že reakcia nie je jednoznačne negatívna ani jednoznačne pozitívna podľa uvedeného opisu, alebo v prípade, že ide o pomoc pri stanovovaní biologickej relevantnosti výsledku, by sa údaje mali odborne posúdiť a/alebo podrobiť ďalšiemu skúmaniu. Prípadne by mohlo byť užitočné uskutočnenie opakovaného experimentu pomocou zmenených experimentálnych podmienok [napr. odstup medzi koncentráciami, iné podmienky metabolickej aktivácie (t. j. koncentrácia S9 alebo pôvod S9)].

43. V zriedkavých prípadoch neumožní súbor údajov ani po ďalšom skúmaní vyvodiť záver o pozitívnom alebo negatívnom výsledku. Reakcia na testovanú chemikáliu sa preto uzavrie ako nejednoznačná (interpretovaná ako s rovnakou pravdepodobnosťou pozitívna alebo negatívna).

Správa o teste

44. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— zdroj, číslo šarže, konečný dátum použitia, ak sú tieto informácie k dispozícii,

— stabilita testovanej chemikálie, ak je známa,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle, ak je známa,

— prípadné meranie pH, osmolality a zrazeniny v kultivačnom médiu, do ktorého bola pridaná testovaná chemikália.

▼**M8**

Jednozložkové látky:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Rozpúšťadlo:

— zdôvodnenie výberu rozpúšťadla,

— percentuálny podiel rozpúšťadla v konečnom kultivačnom médiu.

Bunky:

Pre hlavné laboratórne kultúry:

— typ, zdroj bunkových línií,

— počet pasáží, ak je dostupný, a história laboratória,

— vlastnosti karyotypu a/alebo modálny počet chromozómov,

— metódy udržiavania bunkových kultúr,

— neprítomnosť mykoplazmy,

— časy zdvojenia buniek.

Podmienky testovania:

— zdôvodnenie výberu koncentrácií a počtu kultúr vrátane napríklad údajov o cytotoxicite a obmedzení rozpustnosti,

— skladba média, koncentrácia CO_2, úroveň vlhkosti,

— koncentrácia testovanej chemikálie vyjadrená ako konečná koncentrácia v kultivačnom médiu (napr. µg alebo mg/ml alebo mM kultivačného média),

— koncentrácia (a/alebo objem) rozpúšťadla a testovanej chemikálie pridaných do kultivačného média,

— inkubačná teplota,

— inkubačný čas,

— trvanie ošetrenia,

— hustota buniek počas ošetrenia,

— typ a zloženie systému metabolickej aktivácie (zdroj S9, metóda prípravy zmesi S9, koncentrácia alebo objem zmesi S9 a S9 v konečnom kultivačnom médiu, kontroly kvality S9),

— látky na pozitívnu a negatívnu kontrolu, konečné koncentrácie pre každú z podmienok ošetrenia;

▼**M8**

— dĺžka doby expresie (vrátane počtu vysadených buniek, subkultúr a harmonogramov kŕmenia, ak je to vhodné),

— identita selektívneho činiteľa a jeho koncentrácia,

— kritériá prijateľnosti testov,

— metódy použité na stanovenie počtu životaschopných a mutantných buniek,

— metódy použité na meranie cytotoxicity,

— akékoľvek doplňujúce informácie týkajúce sa cytotoxicity a použitej metódy,

— dĺžka inkubačného času po očkovaní,

— kritériá na považovanie štúdií za pozitívne, negatívne alebo nejednoznačné,

— metódy použité na určenie pH, osmolality a zrážania.

Výsledky:

— počet ošetrených buniek a počet subkultivovaných buniek pre jednotlivé kultúry,

— merania cytotoxicity a prípadné iné pozorovania,

— známky zrážania a čas ich stanovenia,

— počet buniek naočkovaných v selektívnom a neselektívnom médiu,

— počet kolónií v neselektívnom médiu a počet rezistentných kolónií v selektívnom médiu a súvisiace frekvencie mutácií,

— ak je to možné, závislosť medzi koncentráciou a reakciou,

— údaje o súbežných negatívnych (rozpúšťadlo) a pozitívnych kontrolách (koncentrácie a rozpúšťadlá),

— historické údaje o negatívnych (rozpúšťadlo) a pozitívnych kontrolách obsahujúce rozsahy, stredné hodnoty, štandardné odchýlky a interval spoľahlivosti (napr. 95 %), ako aj počet údajov,

— štatistické analýzy (pre jednotlivé kultúry a spojené paralelné kultúry v odôvodnených prípadoch) a hodnoty p, ak existujú.

Diskusia o výsledkoch.

Záver

LITERATÚRA

(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., 584, 1–256.

(14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. 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, s. 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 pSV2gpt-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, s. 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). K dispozícii na adrese: [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, s. 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. K dispozícii na adrese: [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, s. 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**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Substitučné mutagény bázového páru: chemikálie, ktoré spôsobujú substitúciu bázových párov v DNA.

Chemikália: látka alebo zmes.

Klonovacia účinnosť: percentuálny podiel buniek naočkovaných s nízkou hustotou, ktoré sú rastom schopné vytvoriť kolóniu, ktorú možno spočítať.

Koncentrácie: sú konečné koncentrácie testovanej chemikálie v kultivačnom médiu.

Cytotoxicita: v prípade skúšok v rámci tejto testovacej metódy znamená cytotoxicita pokles relatívneho prežitia ošetrených buniek v porovnaní s negatívnou kontrolou (pozri príslušný odsek).

Priama mutácia: génová mutácia z rodičovského typu na mutantnú formu, ktorá spôsobuje zmenu alebo stratu enzymatickej aktivity alebo funkcie kódovaného proteínu.

Konštrukčné mutagény: chemikálie, ktoré v molekule DNA spôsobujú pridanie alebo deléciu jedného alebo viacerých bázových párov.

Genotoxický: všeobecný výraz, ktorý zahŕňa všetky typy poškodenia DNA alebo chromozómov vrátane zlomov DNA, aduktov, zmien usporiadania, mutácií, chromozómových aberácií a aneuploidie. Nie všetky typy genotoxických účinkov majú za následok mutácie alebo trvalé poškodenie chromozómov.

Médium HAT: médium, ktoré obsahuje hypoxantín, aminopterín a tymidín a slúži na odstránenie mutantov HPRT.

Mitotická rekombinácia: rekombinácia medzi homológnymi chromatidmi počas mitózy, ktorá môže potenciálne indukovať zlom dvojvláknového reťazca DNA alebo stratu heterozygozity.

Médium MPA: médium, ktoré obsahuje xantín, adenín, tymidín, aminopterín a kyselinu mykofenolovú a slúži na odstránenie mutantov XPRT.

Mutagénny: produkujúci dedičnú zmenu sekvencie(-í) párov báz DNA v génoch alebo štruktúry chromozómov (chromozómové aberácie).

Frekvencia mutácií (MF): podiel počtu zistených mutantných kolónií a počtu buniek naočkovaných v selektívnom médiu, ktorý sa upraví na základe klonovacej účinnosti (alebo životaschopnosti) v čase selekcie.

Čas do prejavenia fenotypu: Čas po ošetrení, počas ktorého prebieha genetická zmena v rámci genómu a už existujúce génové produkty sa vyčerpajú až do bodu, keď dôjde k zmene fenotypovej charakteristiky.

Relatívne prežitie (RS): na základe relatívneho prežitia sa meria cytotoxicita súvisiaca s ošetrením. Relatívne prežitie predstavuje klonovaciu účinnosť (CE) buniek naočkovaných bezprostredne po ošetrení pri zohľadnení všetkých strát buniek počas ošetrenia v porovnaní s klonovacou účinnosťou negatívnych kontrol (ktorým je priradená miera prežitia 100 %).

Frakcie pečene S9: supernatant pečeňového homogenátu po odstredení pri 9 000 g, t. j. surový pečeňový extrakt.

▼**M8**

Zmes S9: zmes frakcie pečene S9 a kofaktorov potrebných pre aktivitu metabolických enzýmov.

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla: všeobecný termín na vymedzenie kontrolných kultúr, ku ktorým sa pridáva len rozpúšťadlo používané na rozpúšťanie testovanej chemikálie.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Neošetrená kontrola: kultúry, ktoré sa neošetrujú (t. j. testovanou chemikáliou ani rozpúšťadlom), ale sa spracovávajú súbežne a rovnakým spôsobom ako kultúry, ku ktorým sa pridáva testovaná chemikália.

UVCB: chemické látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

▼M8

Dodatok 2

VZORCE NA POSÚDENIE CYTOTOXICITY A FREKVENCIE MUTÁCIÍ

Cytotoxicita sa hodnotí na základe relatívneho prežitia, t. j. klonovacej účinnosti (CE) buniek naočkovaných bezprostredne po ošetrení pri zohľadnení všetkých strát buniek počas ošetrenia v porovnaní s upravenou klonovacou účinnosťou negatívnych kontrol (ktorým je priradená miera prežitia 100 %) (pozri vzorec relatívneho prežitia ďalej).

Upravená klonovacia účinnosť pre kultúru ošetrenú pomocou testovanej chemikálie sa vypočíta ako:

$$\text{Upravená CE} = \frac{\text{počet buniek na konci ošetrenia}}{\text{počet buniek na začiatku ošetrenia}}$$

Relatívne prežitie (RS) pre kultúru ošetrenú pomocou testovanej chemikálie sa vypočíta ako:

$$\text{RS} = \frac{\text{upravená CE vošetrenej kultúre}}{\text{upravená CE vkontrole srozpúšťadlom}} \times 100$$

Frekvencia mutácií predstavuje podiel klonovacej účinnosti mutantných kolónií v selektívnom médiu a klonovacej účinnosti v neselektívnom médiu, ktorá sa meria pre tú istú kultúru v čase selekcie.

$$\text{Frekvencia mutácií} = \frac{\text{klonovacia účinnosť mutantných kolónií vselektívnom médiu}}{\text{klonovacia účinnosť vneselektívnom médiu}}$$

Keď sa na účely klonovacej účinnosti používajú Petriho misky:

Klonovacia účinnosť = počet kolónií/počet naočkovaných buniek.

Keď sa na účely klonovacej účinnosti používajú mikrotitračné platničky:

Počet kolónií na jamku mikrotitračnej platničky zodpovedá Poissonovmu rozdeleniu.

Klonovacia účinnosť = –LnP(0)/počet naočkovaných buniek na jednu jamku

Keď –LnP(0) je pravdepodobný počet prázdnych jamiek spomedzi nasadených jamiek a opisuje ho tento vzorec:

LnP(0) = –Ln (počet prázdnych jamiek/počet naočkovaných jamiek).

▼M7

_____

_____

_____

▼B

B.21. **TESTY BUNKOVEJ TRANSFORMÁCIE CICAVČÍCH BUNIEK *IN VITRO***

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Systémy kultúr cicavčích buniek sa používajú na určenie fenotypových zmien indukovaných *in vitro* chemickými látkami, ktoré súvisia s malígnou transformáciou *in vivo*. Medzi často používané bunky patria C3H10$T_{1/2}$, 3T3, SHE, Fischer bunky potkanov. Testy sa zakladajú na zmenách bunkovej morfológie, vytváraní ohnísk alebo zmenách v schopnosti priľnúť na polopevnom agare. Existujú aj menej používané systémy, ktoré detekujú iné fyziologické a morfologické zmeny v bunkách, vznikajúce ako dôsledok vystavenia karcinogénnym chemikáliám. Žiadny zo záverov *in vitro* testov nepreukázal mechanické spojenie s rakovinou. Niektoré z testovacích systémov majú schopnosť odhaľovať nádorové promótory. Cytotoxicita sa môže určiť meraním vplyvu testovaného materiálu na schopnosti tvorby kolónií (klonovacia účinnosť) alebo meraním rýchlosti rastu kultúr. Meranie cytotoxicity má za cieľ preukázať, že vystavenie testovanej chemikálii bolo toxikologicky závažné, ale nemôže sa použiť na výpočet frekvencie transformácií vo všetkých testoch, keďže niektoré môžu vyžadovať predĺženú inkubáciu a/alebo opätovné naočkovanie.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Príprava

B u n k y

Dostupné sú rozmanité bunkové línie alebo primárne bunky a to v závislosti od použitého transformačného testu. Výskumník musí zaručiť, aby bunky v uskutočňovanom teste vykazovali vhodnú zmenu fenotypu po vystavení známym karcinogénom a aby test v laboratóriu výskumníka bol dokázateľne platný, spoľahlivý a zdokumentovaný.

M é d i u m

Používajú sa médiá a experimentálne podmienky, ktoré zodpovedajú používanému transformačnému testu.

▼B

Testovaná látka

Testované látky sa môžu pripraviť v kultivačnom médiu alebo rozpustiť, alebo rozsuspendovať vo vhodnom nosiči predtým, ako dôjde k ovplyvneniu buniek. Konečná koncentrácia nosiča v kultivačnom systéme by nemala ovplyvňovať životaschopnosť bunky, rýchlosť rastu alebo výskyt transformácií.

Metabolická aktivácia

Bunky majú byť vystavené testovanej látke tak v prítomnosti, ako aj v neprítomnosti vhodného metabolického aktivačného systému. V eventuálnom prípade, keď sa používajú typy buniek s endogénnou metabolickou aktivitou, by malo byť známe, že povaha aktivity je vhodná pre testované chemické triedy.

Testovacie podmienky

Použitie negatívnych a pozitívnych kontrol

Pozitívne kontroly, ktoré využívajú priamo pôsobiace zlúčeniny a zlúčeniny vyžadujúce metabolickú aktiváciu, majú byť súčasťou každého experimentu; negatívnu kontrolu (nosič) je taktiež potrebné použiť.

Nasledujú príklady látok, ktoré môžu byť použité ako pozitívna kontrola:

— priamo pôsobiace chemikálie:

  — etylmetánsulfonát,

  — β-propiolaktón,

— zlúčeniny vyžadujúce metabolickú aktiváciu:

  — 2-acetylaminofluorén,

  — 4-dimetylaminoazobenzén,

  — 7,12-dimetylbenzantracén.

V prípade, že je to primerané, mala by sa zahrnúť ďalšia pozitívna kontrola rovnakej chemickej triedy, ako je testovaná látka.

Koncentrácie vystavenia

Používa sa niekoľko koncentrácií testovanej látky. Tieto koncentrácie majú poskytovať toxický efekt spôsobený koncentráciou, najvyššia koncentrácia spôsobujúca nízku úroveň prežívania a prežívanie pri najnižšej koncentrácii by malo byť približne rovnaké ako pri negatívnej kontrole. Vo vode ťažko rozpustné látky sa majú testovať až do úrovne rozpustnosti s použitím vhodných postupov. Pre voľne rozpustné netoxické látky sa horná koncentrácia testovanej látky určuje od prípadu k prípadu.

▼B

Postup

Na základe použitého testovacieho systému sa bunky ovplyvňujú počas primeraného časového intervalu a ak je vystavenie predĺžené, môže zahŕňať opätovné vystavenie sprevádzané výmenou živnej pôdy (a ak je nevyhnutné, čerstvou zmesou metabolického aktivátora). Bunky bez dostatočnej endogénnej metabolickej aktivity sa vystavujú testovanej látke ako v prítomnosti tak aj v neprítomnosti vhodného metabolického aktivačného systému. Na konci doby vystavenia sa bunky premyjú, zbavia testovanej látky a kultivujú za podmienok vhodných na monitorovanie transformovaného fenotypu a stanoví sa rozsah zistených transformácií. Všetky výsledky sa potvrdia nezávislým experimentom.

2. **ÚDAJE**

Údaje sa prezentujú vo forme tabuliek v rôznych formách v závislosti na uskutočnenom teste, napr. zhodnotenie platní, pozitívne platne alebo počet transformovaných buniek. V prípadoch, kde je to možné, prežívanie sa má vyjadriť ako percento úrovne hodnôt kontrolných vzoriek a frekvencia transformácie sa má vyjadriť ako počet transformantov na počet prežívajúcich buniek. Údaje sa vyhodnocujú pomocou vhodných štatistických metód.

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

V prípade, že je to možné, správa z testu obsahuje nasledujúce informácie:

— použitý typ buniek, počet bunkových kultúr, metódy na udržiavanie bunkových kultúr,

— testovacie podmienky, koncentrácia testovanej látky, použitý nosič, inkubačný čas, trvanie a frekvenciu ovplyvňovania, hustotu buniek počas ovplyvňovania, typ použitého exogénneho metabolického aktivačného systému, pozitívne a negatívne kontroly, špecifikáciu sledovaného fenotypu, použitý selekčný systém (ak je potrebný), odôvodnenie výberu dávok,

— použité metódy na výpočet počtu životaschopných a transformovaných buniek,

— štatistické vyhodnotenie,

— diskusiu o výsledkoch,

— interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

▼M8

B.22. TEST DOMINANTNÝCH LETÁLNYCH MUTÁCIÍ PRI HLODAVCOCH

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda (TM) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 478 (2016). Testovacie metódy sa pravidelne revidujú vzhľadom na vedecký pokrok, zmeny regulačných potrieb a faktory dobrých životných podmienok zvierat. Táto upravená verzia testovacej metódy zohľadňuje viac než tridsaťročné skúsenosti s týmto testom a potenciál na integrovanie alebo kombinovanie tohto testu s inými testmi toxicity, napríklad v rámci štúdií vývojovej, reprodukčnej toxicity alebo genotoxicity. Vzhľadom na obmedzenia tohto testu a používanie veľkého počtu zvierat však táto skúška nie je určená na to, aby sa používala ako primárna metóda, ale skôr ako doplnková testovacia metóda, ktorú možno použiť, len ak neexistuje žiadna alternatíva z hľadiska regulačných požiadaviek. Kombinovanie testov toxicity potenciálne umožňuje ušetriť veľké počty zvierat, ktoré by sa inak využívali v rámci testov toxicity. Bol vypracovaný dokument OECD, ktorý obsahuje stručné informácie o testovaní v oblasti genetickej toxikológie a prehľad posledných zmien, ktoré sa vykonali v usmerneniach OECD na vykonávanie testov v oblasti genetickej toxicity (1).

2. Účelom testu dominantných letálnych mutácií (DL) je skúmať, či chemikálie vyvolávajú mutácie v dôsledku chromozómových aberácií v zárodočných bunkách. Okrem toho je test dominantných letálnych mutácií relevantný pre hodnotenie genotoxicity, pretože faktory *in vivo* metabolizmu, farmakokinetiky a opravných procesov DNA sú aktívne a prispievajú k reakciám, hoci sú v prípade rôznych druhov odlišné. Vyvolanie dominantných letálnych mutácií po vystavení testovanej chemikálii naznačuje, že chemikália ovplyvnila zárodočné tkanivá pokusného zvieraťa.

3. Dominantné letálne mutácie spôsobujú smrť embrya alebo plodu. Vyvolanie dominantných letálnych mutácií po vystavení testovanej chemikálii naznačuje, že chemikália ovplyvnila zárodočné bunky pokusného zvieraťa.

4. Skúška dominantných letálnych mutácií je užitočná na potvrdenie pozitívnych výsledkov testov pomocou somatických sledovaných parametrov *in vivo* a je relevantným sledovaným parametrom na predikciu nebezpečnosti pre ľudí a rizika genetických chorôb prenášaných prostredníctvom zárodočnej línie. Táto skúška je však prácna a vyžaduje si vysoký počet zvierat, v dôsledku čoho je jej uskutočnenie veľmi drahé a časovo náročné. Keďže spontánna frekvencia dominantných letálnych mutácií je pomerne vysoká, má táto skúška všeobecne obmedzenú citlivosť pri detekcii malých zvýšení frekvencie mutácií.

5. Vymedzenie kľúčových pojmov je uvedené v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY

6. Tento test sa najčastejšie uskutočňuje na myšiach (2) (3) (4), ale ak je to vedecky opodstatnené, v niektorých prípadoch môžu byť vhodné aj iné druhy, napríklad potkany (5) (6) (7) (8). Dominantné letálne mutácie sú vo všeobecnosti dôsledkom veľkých chromozómových aberácií (štrukturálnych a numerických abnormalít) (9) (10) (11), nemožno však vylúčiť ani génové mutácie. Dominantná letálna mutácia je mutácia, ku

▼M8

ktorej dochádza v zárodočnej bunke ako takej alebo ktorá vznikne po oplodnení v skorých fázach embrya, pričom nespôsobuje dysfunkciu gaméty, ale je letálna pre oplodnené vajíčko alebo vyvíjajúce sa embryo.

7. Jednotlivé samce sa postupne pária s panenskými samicami vo vhodných intervaloch. Počet párení po ošetrení závisí od konečného účelu štúdie dominantných letálnych mutácií (odsek 23) a má zabezpečiť, aby sa z hľadiska dominantných letálnych mutácií posúdili všetky fázy dozrievania samčej zárodočnej bunky (12).

8. Ak existujú dôkazy, že testovaná chemikália alebo jej metabolity nedosiahnu semenníky, nie je vhodné tento test použiť.

PRINCÍP TESTU

9. Vo všeobecnosti sa samčí jedinci vystavia testovanej chemikálii prostredníctvom vhodného spôsobu expozície a pária sa s neovplyvnenými panenskými samičkami. Rôzne typy zárodočných buniek možno testovať s využitím postupných intervalov párenia. Po uplynutí primeraného času po párení sa samice usmrtia a vyšetrením ich maternic sa určí počet implantátov a živých a mŕtvych embryí. Dominantná letalita testovanej chemikálie sa určí porovnaním počtu živých implantátov na samicu v ošetrenej skupine s počtom živých implantátov na samicu v kontrolnej skupine s nosičom/v kontrolnej skupine s aplikáciou rozpúšťadla. Zvýšenie počtu mŕtvych implantátov na samicu v ošetrenej skupine v porovnaní s počtom mŕtvych implantátov na samicu v kontrolnej skupine odráža postimplantačné straty vyvolané testovanou chemikáliou. Postimplantačné straty sa vypočítajú stanovením pomeru mŕtvych implantátov k celkovému počtu implantátov v ošetrenej skupine v porovnaní s pomerom mŕtvych implantátov k celkovému počtu implantátov v kontrolnej skupine. Predimplantačné straty sa môžu odhadnúť na základe porovnania rozdielu počtu žltých teliesok a celkového počtu implantátov alebo porovnaním všetkých implantátov na samicu v ošetrenej a v kontrolnej skupine.

OVEROVANIE SPÔSOBILOSTI LABORATÓRIA

10. Kompetencia na vykonávanie tejto skúšky sa určí preukázaním schopnosti reprodukovať frekvencie dominantných letálnych mutácií z publikovaných údajov [napr. (13) (14) (15) (16) (17) (18)] s látkami, ktoré slúžia ako pozitívna kontrola (vrátane slabých reakcií), napríklad s látkami uvedenými v tabuľke 1, a s kontrolnými skupinami s nosičom, a získaním frekvencií z negatívnych kontrol, ktoré sú v súlade s prijateľným rozsahom údajov (pozri referencie uvedené vyššie) alebo s distribúciou historických kontrol laboratória, ak je k dispozícii.

OPIS METÓDY

Príprava

Výber druhov zvierat

11. Mali by sa vyberať bežne používané laboratórne kmene zdravých pohlavne dospelých zvierat. Bežne sa používajú myši, vhodné však môžu byť aj potkany. Použiť možno akékoľvek iné vhodné druhy cicavcov, ak je to vedecky zdôvodnené v správe.

▼M8

Podmienky umiestnenia a kŕmenia zvierat

12. V prípade hlodavcov by mala byť teplota v miestnosti pre zvieratá 22 °C (±3 °C). Hoci relatívna vlhkosť by mala byť ideálne 50 – 60 %, mala by dosahovať minimálne 40 % a pokiaľ možno, okrem obdobia počas čistenia miestnosti, by nemala presiahnuť 70 %. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej chemikálie, keď sa podáva touto cestou. Pred ošetrením alebo párením sa hlodavce umiestnia do malých skupín (najviac päťčlenných) rovnakého pohlavia, pokiaľ sa neočakáva ani nepozoruje agresívne správanie, a to prednostne v pevných klietkach s vhodným obohatením prostredia. Ak to je vedecky opodstatnené, zvieratá môžu byť umiestnené samostatne.

Príprava zvierat

13. Zdravé, pohlavne zrelé a dospelé samčie a samičie zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Každé zviera sa jednotlivo označí humánnou, minimálne invazívnou metódou (napr. krúžkovanie, označenie štítkom, aplikácia mikročipu alebo biometrická identifikácia, nie však skracovanie prstov ani uší) a aklimatizuje sa na laboratórne podmienky v priebehu minimálne piatich dní. Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy spôsobené ich umiestnením. Malo by sa zabrániť krížovej kontaminácii pozitívnou kontrolou a testovanou chemikáliou. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variabilita zvierat minimálna a nemala by presiahnuť ±20 % priemernej hmotnosti každého pohlavia.

Príprava dávok

14. Tuhé testované chemikálie by sa pred podávaním dávok zvieratám mali rozpustiť alebo suspendovať vo vhodných rozpúšťadlách alebo nosičoch alebo primiešať do krmiva alebo pitnej vody. Kvapalné testované chemikálie sa môžu podávať priamo alebo rozriedené pred podávaním. V prípade inhalačných expozícií sa testované chemikálie môžu v závislosti od svojich fyzikálnochemických vlastností podávať ako plyn, výpary alebo tuhé/kvapalné aerosóly. Ak údaje o stabilite nepreukazujú prijateľnosť uskladnenia a nestanovujú vhodné podmienky skladovania, mali by sa používať čerstvo pripravené testované chemikálie.

Podmienky testovania

Rozpúšťadlo/nosič

15. Rozpúšťadlo/nosič by nemal vyvolávať toxické účinky v používaných objemoch dávok a nemalo by pri nich existovať podozrenie na možnosť chemickej reakcie s testovanou chemikáliou. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by mali podporiť referenčné údaje uvádzajúce ich kompatibilitu. Odporúča sa, aby sa vždy, keď je to možné, najskôr zvážilo použitie vodného rozpúšťadla/nosiča. Príklady bežne používaných kompatibilných rozpúšťadiel/nosičov zahŕňajú vodu, fyziologický roztok, roztok metylcelulózy, roztok sodnej soli karboxymetylcelulózy, olivový olej a kukuričný olej.

Pozitívne kontroly

16. Pokiaľ laboratórium nepreukázalo spôsobilosť pri vykonávaní testu a bežne nepoužívalo test v nedávnej minulosti (napr. počas posledných 5 rokov), vždy sa majú používať zvieratá na súbežné pozitívne kontroly. Nie je však potrebné ošetriť zvieratá v rámci pozitívnej kontroly rovnakým spôsobom ako zvieratá, ktorým sa podáva testovaná chemikália, ani odoberať vzorky pri všetkých intervaloch párenia. O látkach na pozitívnu kontrolu má byť

▼M8

známe, že vyvolávajú dominantné letálne mutácie pri podmienkach použitých v teste. S výnimkou ošetrenia sa so zvieratami v kontrolných skupinách zaobchádza rovnakým spôsobom ako so zvieratami v ošetrenej skupine.

17. Dávky látok na pozitívnu kontrolu sa zvolia tak, aby vyvolávali slabé až mierne účinky, na základe ktorých možno kriticky posúdiť funkčnosť a citlivosť skúšky, pričom majú konzistentne vyvolávať pozitívne dominantné letálne mutácie. Príklady látok na pozitívnu kontrolu a vhodných dávok sú uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Príklady látok na pozitívnu kontrolu

Látka [č. CAS] (referenčné č.)	Rozsah efektívnej dávky (mg/kg) (druhy hlodavcov)	Obdobie podávania (v dňoch)
trietylénmelamín [51-18-3] (15)	0,25 (myši)	1.
cyklofosfamid [50-18-0] (19)	50 – 150 (myši)	5.
cyklofosfamid [50-18-0] (5)	25 – 100 (potkany)	1.
etyl-metánsulfonát [62-50-0] (13)	100 – 300 (myši)	5.
monomerický akrylamid [79-06-1] (17)	50 (myši)	5.
chlorambucil [305-03-3] (14)	25 (myši)	1.

Negatívne kontroly

18. Súčasťou každého času odberu vzoriek by mali byť zvieratá z negatívnych kontrol ošetrované len s rozpúšťadlom alebo nosičom, s ktorými sa inak zaobchádza rovnako ako s pokusnými skupinami (20). Ak neexistujú historické alebo zverejnené kontrolné údaje, ktoré by preukazovali, že zvolené rozpúšťadlo/nosič nespôsobujú žiadne dominantné letálne mutácie ani iné nepriaznivé vplyvy, zvieratá z neošetrenej kontroly by mali byť súčasťou aj každého času odberu vzoriek na stanovenie prijateľnosti kontroly s nosičom.

POSTUP

Počet zvierat

19. Jednotlivé samce sa postupne pária vo vhodne zvolených intervaloch (napr. v týždenných intervaloch, odseky 21 a 23) prednostne s jednou panenskou samičkou. Počet samcov v jednej skupine sa vopred určí tak, aby mal (v kombinácii s počtom spárených samíc v jednotlivých intervaloch párenia) dostatočnú štatistickú váhu potrebnú na zistenie minimálne zdvojnásobenia frekvencie dominantných letálnych mutácií (odsek 44).

20. Počet samíc na jeden interval párenia je takisto potrebné vopred určiť na základe výpočtov štatistickej váhy tak, aby umožňoval detekciu minimálne zdvojnásobenia frekvencie dominantných letálnych mutácií (t. j. dostatočný počet gravidných samíc, aby celkovo poskytli aspoň 400 implantátov) (20) (21) (22) (23), pričom sa očakáva aspoň jeden mŕtvy implantát na jednotku analýzy (t. j. skupina párenia na dávku) (24).

▼M8

Obdobie podávania a intervaly párenia

21. Počet intervalov párenia nasledujúcich po ošetrení sa riadi harmonogramom ošetrovania a má zabezpečiť, že sa všetky štádiá dozrievania samčích zárodočných buniek posúdia z hľadiska vyvolania dominantných letálnych mutácií (12) (25). V prípade jedného ošetrenia do piatich podaní denných dávok sa má uskutočniť 8 (myš) alebo 10 (potkan) párení v týždenných intervaloch po poslednom ošetrení. V prípade viacnásobného podania dávky sa počet intervalov párenia môže znížiť úmerne k predĺženému času obdobia podávania, pričom sa však musí zachovať cieľ posúdenia všetkých štádií spermatogenézy (napr. po 28-dňovej expozícii sú na posúdenie všetkých štádií spermatogenézy pri myšiach dostatočné len 4 párenia v týždenných intervaloch). Všetky harmonogramy ošetrovania a párenia musia byť vedecky odôvodnené.

22. Samice sa majú ponechať so samcami počas aspoň jedného estrálneho cyklu (napr. jeden týždeň pokrýva jeden estrálny cyklus pri myšiach a potkanoch). Samice, ktoré sa nepárili počas týždňového intervalu, možno použiť pre nasledujúci interval párenia. Prípadne sa majú ponechať dovtedy, kým nedôjde k páreniu, čo sa stanoví na základe prítomnosti spermií vo vagíne alebo prítomnosti vaginálnej zátky.

23. Použitý režim expozície a párenia závisí od konečného účelu štúdie dominantných letálnych mutácií. Ak je cieľom určiť, či daná chemikália vyvoláva dominantné letálne mutácie ako také, prijateľnou metódou by bola expozícia počas celého cyklu spermatogenézy (napr. 7 týždňov pri myši, 5 – 7 ošetrení za týždeň) a uskutočnenie jedného párenia na záver. Ak je však cieľom identifikovať typ zárodočnej bunky, ktorý je citlivý z hľadiska vyvolania dominantných letálnych mutácií, uprednostňuje sa jednorazová alebo 5-dňová expozícia, po ktorej nasleduje párenie v týždňových intervaloch.

Úrovne dávok

24. Ak sa z dôvodu, že ešte nie sú dostupné vhodné údaje na pomoc pri výbere dávky, vykoná predbežná štúdia na zistenie rozsahu, mala by sa vykonať v tom istom laboratóriu s použitím toho istého druhu, kmeňa, pohlavia a dávkovacieho režimu, aké majú byť použité v hlavnej štúdii (26). Štúdia by sa mala zamerať na zistenie maximálnej tolerovanej dávky (MTD) definovanej ako najvyššia dávka, ktorá sa bude tolerovať bez dôkazu toxicity obmedzujúcej štúdiu, a to vzhľadom na trvanie štúdie (napr. abnormálne správanie alebo reakcie, menšie zníženie telesnej hmotnosti alebo hematopoetická systémová cytotoxicita), ale nie smrti ani znakov bolesti, utrpenia či stavu, ktorý si vyžaduje humánne usmrtenie (27).

25. Maximálna tolerovaná dávka nesmie zároveň nepriaznivo ovplyvňovať úspešnosť párenia (21).

26. Testované chemikálie s osobitnými biologickými aktivitami pri nízkych netoxických dávkach (ako napríklad hormóny a mitogény) a chemikálie, ktoré vykazujú saturáciu toxikokinetických vlastností, môžu predstavovať výnimku z kritérií na stanovenie dávok a mali by sa hodnotiť prípad od prípadu.

27. Na získanie informácií o vzťahu dávky a účinku by kompletná štúdia mala zahŕňať negatívnu kontrolnú skupinu a minimálne tri úrovne dávok, pričom vo všeobecnosti je každá úroveň dávky dvojnásobkom, no nie viac než štvornásobkom predchádzajúcej. Ak testovaná chemikália nevyvoláva toxicitu v štúdii na zistenie rozsahu alebo na základe existujúcich údajov, najvyššia dávka pri jednorazovom podaní by mala byť 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti. Ak však testovaná chemikália spôsobuje toxicitu, maximálna tolerovaná dávka by mala byť najvyššia podávaná dávka a použité

▼M8

úrovne dávky by mali podľa možnosti pokrývať rozsah od maximálnej dávky po dávku, ktorá spôsobuje slabú alebo nespôsobuje žiadnu toxicitu. V prípade netoxických chemikálií je limitná dávka pre obdobie podávania v trvaní najmenej 14 dní 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti na deň a pre obdobia podávania kratšie ako 14 dní je limitná dávka 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti na deň.

Podávanie dávok

28. Pri plánovaní skúšky by sa mal zvážiť predpokladaný spôsob expozície ľudí. Preto možno ako opodstatnené zvoliť spôsoby expozície napríklad prostredníctvom stravy, pitnej vody, podkožne, intravenózne, topickou cestou, inhalačne, perorálne (pomocou sondy) alebo implantačne. V každom prípade by sa mal zvoliť taký spôsob, ktorým sa zaručí adekvátna expozícia cieľového tkaniva, resp. tkanív. Vo všeobecnosti sa neodporúča použitie intraperitoneálnej injekcie, keďže to nie je zamýšľaný spôsob expozície ľudí, a mal by sa použiť iba v prípade, že je k dispozícii osobitné vedecké zdôvodnenie. Ak je testovaná chemikália primiešaná do krmiva alebo pitnej vody, najmä v prípade jednej dávky, treba dbať na to, aby sa medzi konzumáciou potravy a vody a párením ponechal dostatočný čas, aby sa umožnilo zistenie účinkov (odsek 31). Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže naraz podávať sondou alebo injekciou, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Objem nemá byť zvyčajne vyšší ako 1 ml/100 g telesnej hmotnosti, okrem vodných roztokov, keď sa môže použiť objem najviac 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Použitie väčších objemov ako uvedený objem (pokiaľ to dovoľujú predpisy o dobrých životných podmienkach zvierat) by sa malo zdôvodniť. Zmeny v testovanom objeme sa minimalizujú tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem vzhľadom na telesnú hmotnosť pri všetkých úrovniach dávky.

Pozorovania

29. Najmenej raz denne by sa mali vykonať všeobecné klinické pozorovania testovaných zvierat a zaznamenať klinické príznaky, najlepšie každý deň v rovnakom čase a so zreteľom na časový interval najintenzívnejších predpokladaných účinkov po podaní dávky. Počas obdobia podávania dávok je potrebné aspoň dvakrát denne sledovať chorobnosť a úmrtnosť všetkých zvierat. Všetky zvieratá by sa mali odvážiť na začiatku štúdie, aspoň raz za týždeň počas štúdií s opakovanou dávkou a potom pri usmrtení. Spotreba potravy by sa mala merať aspoň raz týždenne. Ak sa testovaná chemikália podáva v pitnej vode, mala by sa pri každej výmene vody a aspoň raz za týždeň odmerať spotreba vody. Zvieratá, ktoré vykazujú neletálne ukazovatele nadmernej toxicity, by mali byť usmrtené pred dokončením testovacieho obdobia (27).

Odber a spracovanie tkaniva

30. Samice sa usmrtia v druhej polovici gravidity na 13. deň gravidity v prípade myší a 14. – 15. deň gravidity v prípade potkanov. Vyšetrením materníc sa určia dominantné letálne mutácie a stanoví sa počet implantátov, živých a mŕtvych embryí a žltých teliesok.

31. Rohy maternice a vaječníky sa odhalia, aby bolo možné spočítať žlté telieska, a plody sa vyberú, spočítajú a odvážia. Maternice treba starostlivo vyšetriť a zistiť prípadné resorpcie zakryté živými plodmi, pričom všetky resorpcie je potrebné zaznamenať. Zaznamená sa úmrtnosť plodov. Zaznamená sa aj počet úspešne oplodnených samíc a celkový počet implantácií, predimplantačné straty a postimplantačná úmrtnosť (vrátane skorých a neskorých resorpcií). Okrem toho sa viditeľné plody môžu najmenej dva týždne

▼M8

uchovávať v Bouinovom fixačnom prostriedku a následne sa vyšetrením zistí prítomnosť významných vonkajších malformácií (28) s cieľom získať doplňujúce informácie o reprodukčných a vývojových účinkoch testovanej látky.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Spracovanie výsledkov

32. Údaje sa prezentujú vo forme tabuliek, ktoré ukazujú počet spárených samcov, počet gravidných samíc a počet negravidných samíc. Výsledky každého párenia vrátane identity každého samca a každej samice sa uvádzajú samostatne. Pre každú samicu sa uvedie interval párenia, úroveň dávky ošetrených samcov a počet živých a mŕtvych implantátov.

33. Postimplantačné straty sa vypočítajú stanovením pomeru mŕtvych implantátov k celkovému počtu implantátov z ošetrenej skupiny v porovnaní s pomerom mŕtvych implantátov k celkovému počtu implantátov v kontrolnej skupine s nosičom/v kontrolnej skupine s aplikáciou rozpúšťadla.

34. Predimplantačné straty sa vypočítajú ako rozdiel medzi počtom žltých teliesok a počtom implantátov alebo ako zníženie priemerného počtu implantátov na samicu v porovnaní s kontrolnými pároveniami. Je potrebné uviesť, ak sa predimplantačné straty určia odhadom.

35. Faktor dominantnej letálnej mutácie sa odhaduje ako: (postimplantačné úmrtia/celkový počet implantácií na samicu) × 100.

36. Treba vykazovať údaje o toxicite a o klinických príznakoch (podľa odseku 29).

Kritériá prijateľnosti

37. Prijateľnosť testu určujú tieto kritériá:

— Súbežná negatívna kontrola je v súlade so zverejnenými normami pre údaje historických negatívnych kontrol a s údajmi laboratória o historických kontrolách, ak sú k dispozícii (pozri odseky 10 a 18).

— Súbežné pozitívne kontroly vyvolávajú reakcie, ktoré sú v súlade so zverejnenými normami pre údaje historických pozitívnych kontrol alebo s údajmi laboratória o historických pozitívnych kontrolách, ak sú k dispozícii, a vedú k štatisticky významnému nárastu v porovnaní s negatívnou kontrolou (pozri odseky 17 a 18).

— Analyzoval sa primeraný celkový počet implantátov a dávok (odsek 20).

— Kritériá výberu najvyššej dávky sú v súlade s kritériami opísanými v odsekoch 24 a 27.

Hodnotenie a interpretácia výsledkov

38. Na zabezpečenie dostatočných údajov na analýzu vzťahu medzi dávkou a reakciou treba analyzovať najmenej tri skupiny ošetrené podaním dávky.

▼M8

39. Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, testovaná chemikália sa pokladá za jednoznačne pozitívnu, ak:

— najmenej jedna z testovaných dávok vykazuje štatisticky významný nárast v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

— ide o nárast, ktorý pri hodnotení vhodným testom potvrdí súvislosť s dávkou najmenej pri jednej experimentálnej podmienke (napr. týždenný interval párenia), a

— niektorý z týchto výsledkov je mimo prijateľného rozsahu údajov negatívnych kontrol alebo distribúcie historických údajov negatívnych kontrol laboratória (napr. 95 % regulačných medzí Poissonovho rozdelenia), ak sú k dispozícii.

Testovaná chemikália sa vtedy považuje za schopnú vyvolať dominantné letálne mutácie v zárodočných bunkách pokusných zvierat. Odporúčania týkajúce sa najvhodnejších štatistických metód sú opísané v odseku 44. Iné odporúčané štatistické prístupy možno nájsť aj v literatúre (20) (21) (22) (24) (29). V použitých štatistických testoch by sa malo zviera posudzovať ako pokusná jednotka.

40. Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, testovaná chemikália sa pokladá za jednoznačne negatívnu, ak:

— ani jedna z testovaných dávok nevykazuje štatisticky významný nárast v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

— neexistuje nárast súvisiaci s dávkou pri žiadnej experimentálnej podmienke a

— všetky výsledky sú v rámci prijateľného rozsahu údajov negatívnych kontrol alebo historických údajov negatívnych kontrol laboratória (napr. 95 % regulačných medzí Poissonovho rozdelenia), ak sú k dispozícii.

Testovaná chemikália sa vtedy považuje za neschopnú vyvolať dominantné letálne mutácie v zárodočných bunkách pokusných zvierat.

41. Neexistuje požiadavka na overenie jednoznačne pozitívnej alebo jednoznačne negatívnej reakcie.

42. Ak reakcia nie je jednoznačne negatívna ani pozitívna a má sa pomôcť pri stanovení biologickej relevantnosti výsledku (napr. slabé alebo hraničné zvýšenie), údaje by sa mali vyhodnotiť na základe odborného posúdenia a/alebo ďalšieho skúmania pomocou existujúcich experimentálnych údajov, napríklad posúdením, či je pozitívny výsledok mimo prijateľného rozsahu údajov negatívnych kontrol alebo historických údajov negatívnych kontrol laboratória (30).

43. V zriedkavých prípadoch, dokonca aj po ďalších skúmaniach, nemusí byť na základe daného súboru údajov možné dospieť k záveru o pozitívnych alebo negatívnych výsledkoch, a preto sa takéto údaje budú považovať za nejednoznačné.

44. V použitých štatistických testoch by sa malo samčie zviera posudzovať ako pokusná jednotka. Hoci je možné, že údaje o počtoch (napr. počet implantátov na samicu) môžu zodpovedať Poissonovmu rozdeleniu a/alebo pomery (napr. pomer mŕtvych implantátov) môžu mať binomické rozdelenie, často sa stáva, že takéto údaje majú nadmerný rozptyl (31). V rámci štatistickej analýzy by sa malo tak najskôr uskutočniť testovanie nadmerného alebo nedostatočného rozptylu pomocou testov rozptylu, ako je napr. Cochranov binomický test rozptylu (32) alebo Taroneho test C(α) na určenie binomického nadmerného rozptylu (31) (33). Ak sa nezistí odchýlka od binomického rozdelenia, trendy v pomeroch v rámci úrovní dávok možno testovať pomocou testovania trendov podľa Cochranovho a Armitageovho testu (34) a párové porovnania s kontrolnou skupinou možno testovať pomocou Fisherovho exaktného testu (35). Podobne, ak sa nezistí odchýlka od

▼M8

Poissonovho rozdelenia, trendy v počtoch možno testovať pomocou Poissonovej regresie (36) a párové porovnania s kontrolnou skupinou možno testovať v kontexte Poissonovho modelu pomocou párových kontrastov (36). Ak sa zistí značný nadmerný alebo nedostatočný rozptyl, odporúčajú sa neparametrické metódy (23) (31). Patria sem testy založené na poradí, napríklad Jonckheereho-Terpstrov test trendu (37) Mannove-Whitneyho testy (38) párových porovnaní s kontrolnou skupinou s nosičom/s kontrolnou skupinou s aplikáciou rozpúšťadla, ako aj testy na základe permutácie, prevzorkovania alebo testy typu „bootstrap“ pre trendové a párové porovnania s kontrolnou skupinou (31) (39).

45. Pozitívna skúška dominantných letálnych mutácií poskytuje dôkaz o genotoxicite testovanej chemikálie v zárodočných bunkách ošetreného samca testovaného druhu.

46. Zváženie toho, či sú pozorované hodnoty v rozsahu historickej kontroly alebo mimo nej, môže poskytnúť usmernenie pri hodnotení biologického významu reakcie (40).

Správa o teste

47. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Zhrnutie.

Testovaná chemikália:

— zdroj, číslo šarže, konečný dátum použitia, ak sú tieto informácie k dispozícii,

— stabilita testovanej chemikálie, ak je známa,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle, ak je známa,

— prípadné meranie pH, osmolality a zrazeniny v kultivačnom médiu, do ktorého bola pridaná testovaná chemikália.

Jednozložkové látky:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Príprava testovanej chemikálie:

— zdôvodnenie voľby nosiča,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa,

▼M8

— príprava potravy, pitnej vody alebo inhalačných prípravkov,

— analytické stanovenie prípravkov (napr. stabilita, homogenita, nominálne koncentrácie) v prípade, že sa vykonávajú.

Testované zvieratá:

— použitý druh/kmeň a odôvodnenie voľby,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky umiestnenia, potrava atď.,

— metóda na jedinečnú identifikáciu zvierat,

— pre krátkodobé štúdie: telesná hmotnosť jednotlivých samčích zvierat na začiatku a na konci testu, v prípade štúdií dlhších ako jeden týždeň: telesná hmotnosť jednotlivých zvierat počas štúdie a spotreba potravy. Mali by sa uviesť aj rozsah telesnej hmotnosti, stredná hodnota a štandardná odchýlka pre každú skupinu.

Podmienky testovania:

— údaje z pozitívnych a negatívnych (rozpúšťadlo/nosič) kontrol,

— údaje zo štúdie na zistenie rozsahu,

— odôvodnenie výberu úrovne dávky,

— podrobné údaje o príprave testovanej chemikálie,

— podrobné údaje o podávaní testovanej chemikálie,

— odôvodnenie cesty podania,

— metódy merania toxicity pre zvieratá vrátane, keď to je možné, histopatologických alebo hematologických analýz a frekvencia pozorovaní a vážení zvierat,

— metódy overovania, či sa testovaná chemikália dostala do cieľového tkaniva alebo hlavného obehu v prípade negatívnych výsledkov,

— skutočná dávka (mg/kg telesnej hmotnosti/deň) vypočítaná z koncentrácie testovanej chemikálie (ppm) v potrave/pitnej vode a zo spotreby potravy/pitnej vody, ak sa uplatňuje,

— podrobné informácie o kvalite potravy a vody,

— podrobné informácie o obohatení prostredia klietky,

— podrobný opis harmonogramu ošetrovania a harmonogramu odberu vzoriek a zdôvodnenie ich voľby,

— metóda analgézie,

— metóda usmrtenia,

▼**M8**

— postupy izolácie a uchovávania tkanív,

— zdroj a čísla šarží všetkých súprav a reakčných činidiel (v náležitých prípadoch),

— metódy vyčísľovania dominantných letálnych mutácií,

— harmonogram párenia,

— metódy použité na stanovenie toho, že sa uskutočnilo párenie,

— čas usmrtenia,

— kritériá hodnotenia účinkov dominantných letálnych mutácií vrátane údajov o žltých telieskach, implantáciách, resorpciách a predimplantačných stratách, živých implantátoch, mŕtvych implantátoch.

Výsledky:

— stav zvieraťa pred testovaním a počas obdobia testovania vrátane toxických príznakov,

— telesná hmotnosť samcov počas období ošetrovania a párenia,

— počet spárených samíc,

— vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je možné ho určiť,

— súbežné a historické údaje o negatívnych kontrolách s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami,

— súbežné údaje o pozitívnych kontrolách,

— údaje v tabuľkovej forme o jednotlivých matkách vrátane počtu žltých teliesok na matku, počtu implantácií na matku, počtu resorpcií a predimplantačných strát na matku, počtu živých implantátov na matku, počtu mŕtvych implantátov na matku, hmotnosti plodu,

— vyššie uvedené údaje zhrnuté za jednotlivé obdobia párenia a dávky s uvedením frekvencie dominantných letálnych mutácií,

— použité štatistické analýzy a metódy.

Diskusia o výsledkoch.

Záver.

LITERATÚRA

(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.) s. 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, s. 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.), s. 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**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Chemikália: látka alebo zmes.

Žlté teliesko (Corpus luteum): štruktúra vylučujúca hormóny, ktorá vzniká na vaječníku v mieste folikulu, ktorý uvoľnil vajíčko. Počet žltých teliesok vo vaječníkoch zodpovedá počtu ovulovaných vajíčok.

Dominantná letálna mutácia: mutácia, ku ktorej dochádza v zárodočnej bunke alebo ktorá vznikne po oplodnení, spôsobujúca smrť embrya alebo plodu.

Miera plodnosti: počet spárených gravidných samíc na počet spárených samíc.

Interval párenia: čas medzi skončením expozície a párením ošetrených samcov. Kontrolou tohto intervalu je možné posúdiť chemické účinky na rôznych typoch zárodočných buniek. V rámci párenia myší počas 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. a 8. týždňa sa po skončení expozície merajú účinky na spermie, kondenzované spermatidy, okrúhle spermatidy, pachyténne spermatocyty, rané spermatocyty, diferencované spermatogóniá, diferencované spermatogóniá a spermatogóniá kmeňových buniek.

Preimplantačné straty: rozdiel medzi počtom implantátov a počtom žltých teliesok. Môžu sa odhadnúť aj na základe porovnania celkového počtu implantátov na samicu v ošetrenej a v kontrolnej skupine.

Postimplantačné straty: pomer počtu mŕtvych implantátov v ošetrenej skupine v porovnaní s pomerom počtu implantátov v kontrolnej skupine.

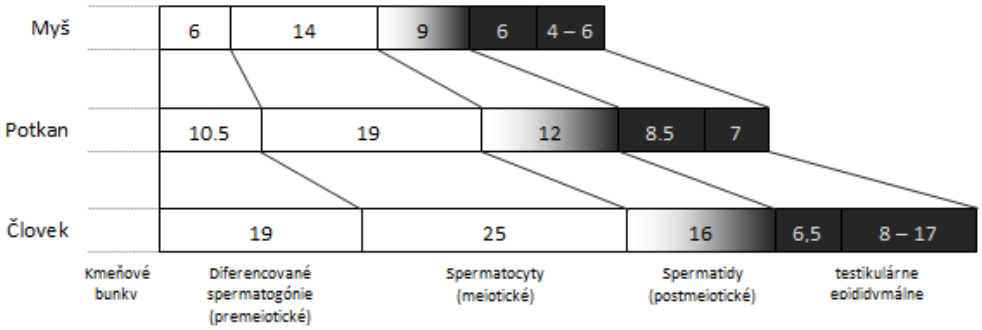
Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

UVCB: chemická látka neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií a biologické materiály.

▼**M8**

Dodatok 2

ČASOVÝ PRIEBEH SPERMATOGENÉZY U CICAVCOV



Obr. 1: Porovnanie obdobia vývoja (v dňoch) samčej zárodočnej bunky u myší, potkanov a ľudí. V časových úsekoch, ktoré sú vytieňované, nedochádza k oprave DNA.

Na obr. 1 je zobrazená schéma spermatogenézy u myší, potkanov a ľudí (prevzaté z publikácie Adler, 1996). Nediferencované spermatogóniá zahŕňajú typy: A – jednoduché (single); A – spárované (paired); a A – usporiadané (aligned) spermatogóniá (Hess a de Franca, 2008). A – jednoduché sa považujú za pravé kmeňové bunky, preto na posúdenie vplyvov na kmeňové bunky musí medzi poslednou injekciou testovanej chemikálie a párením uplynúť aspoň 49 dní (u myší).

Odkazy

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. TEST SPERMATOGONIÁLNEJ CHROMOZÓMOVEJ ABERÁCIE U CICAVCOV

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda (TM) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov 483 (2016). Testovacie metódy sa pravidelne revidujú vzhľadom na vedecký pokrok, zmeny regulačných potrieb a faktory dobrých životných podmienok zvierat. Táto upravená verzia testovacej metódy zohľadňuje veľa rokov skúseností s touto skúškou a potenciál na integrovanie tohto testu do iných štúdií toxicity alebo genotoxicity alebo na kombinovanie s takýmito štúdiami. Kombinovanie štúdií toxicity potenciálne umožňuje znížiť počty zvierat používaných v rámci testov toxicity. Táto testovacia metóda je súčasťou série testovacích metód týkajúcich sa genetickej toxikológie. Bol vypracovaný dokument OECD, ktorý obsahuje stručné informácie o testovaní v oblasti genetickej toxikológie a prehľad posledných zmien, ktoré sa vykonali v usmerneniach OECD na vykonávanie testov v oblasti genetickej toxicity (1).

2. Účelom testu spermatogoniálnej chromozómovej aberácie *in vivo* u cicavcov je identifikovať tie chemikálie, ktoré spôsobujú štrukturálne chromozómové aberácie spermatogoniálnych buniek cicavcov (2) (3) (4). Okrem toho je test relevantný pre hodnotenie genotoxicity, pretože faktory metabolizmu, farmakokinetiky a opravných procesov DNA *in vivo* sú aktívne a prispievajú k odozvám, aj keď môžu byť v prípade rôznych druhov odlišné. Táto testovacia metóda nie je navrhnutá na meranie numerických abnormalít, skúška sa na tento účel nepoužíva rutinne.

3. Týmto testom sa merajú štrukturálne chromozómové aberácie (chromozómového aj chromatidového typu) pri delení spermatogoniálnych zárodočných buniek, a preto sa očakáva, že na jeho základe sa bude dať predpovedať indukcia dedičnej mutácie v týchto zárodočných bunkách.

4. Vymedzenie základných pojmov sa uvádza v dodatku.

POČIATOČNÉ ÚVAHY

5. V tomto teste sa rutinne používajú hlodavce, ale ak je to vedecky opodstatnené, v niektorých prípadoch môžu byť vhodné aj iné druhy. Štandardnými cytogenetickými prípravami semenníkov hlodavcov sa generujú mitotické (spermatogóniá) a meiotické (spermatocyty) metafázy. Mitotické a meiotické metafázy sa určia na základe morfológie chromozómov (4). Týmto cytogenetickým testom *in vivo* sa zisťujú štrukturálne chromozómové aberácie v spermatogoniálnych mitózach. Iné cieľové bunky nie sú predmetom tejto testovacej metódy.

6. Na zistenie aberácie chromatidového typu v spermatogoniálnych bunkách by sa malo skúmať prvé mitotické delenie buniek po ošetrení, predtým ako tieto aberácie v nasledujúcom delení konvertujú na chromozómové aberácie. Ďalšie informácie z ošetrených spermatocytov sa dajú získať analýzou meiotických chromozómov na zistenie štrukturálnych chromozómových aberácií počas diakinézy – metafázy I a metafázy II.

▼M8

7. V semenníkoch sa nachádza viacero generácií spermatogónií (5) a tieto rôzne typy zárodočných buniek môžu vykazovať rôznu škálu citlivosti na chemické ošetrenie. Zistené aberácie predstavujú teda celkovú odozvu populácie ošetrených spermatogoniálnych buniek. Väčšina mitotických buniek v prípravkoch semenníkov sú spermatogóniá B, ktorých bunkový cyklus trvá približne 26 hodín (3).

8. Ak existujú dôkazy, že testovaná chemikália alebo jej metabolity nezasiahnu semenníky, nie je vhodné tento test použiť.

PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

9. Zvieratá sú vo všeobecnosti exponované príslušným spôsobom vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie a vo vhodnom čase po aplikácii testovanej chemikálie sa usmrtia. Pred usmrtením sa zvieratám aplikuje prostriedok zastavujúci metafázu (napr. kolchicín alebo Colcemid®). Následne sa zo zárodočných buniek urobia chromozómové prípravky, zafarbia sa a metafázové bunky sa analyzujú na chromozómové aberácie.

OVEROVANIE SPÔSOBILOSTI LABORATÓRIA

10. Kompetencia na vykonávanie tejto skúšky by sa mala určiť preukázaním schopnosti reprodukovať očakávané výsledky frekvencie štrukturálnych chromozómových aberácií v prípade spermatogónií s látkami, ktoré slúžia ako pozitívna kontrola (vrátane slabých odoziev), napríklad s látkami uvedenými v tabuľke 1, a získaním frekvencií z negatívnych kontrol, ktoré sú v súlade s prijateľným rozsahom kontrolných údajov z publikovanej literatúry [napr. (2) (3) (6) (7) (8) (9) (10)] alebo s rozložením historických kontrol laboratória, ak sú k dispozícii.

OPIS METÓDY

Príprava

Výber druhov zvierat

11. Mali by sa vyberať bežne používané laboratórne kmene zdravých mladých dospelých zvierat. Bežne sa používajú samce myší, ak je to však vedecky opodstatnené a s cieľom umožniť priebeh testu v spojení s inou testovacou metódou, môžu sa použiť samce iných vhodných druhov cicavcov. V správe by malo byť poskytnuté vedecké zdôvodnenie použitia iných druhov než hlodavcov.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia zvierat

12. V prípade hlodavcov by mala byť teplota v miestnosti pre zvieratá 22 °C (±3 °C). Hoci relatívna vlhkosť by mala byť ideálne 50 – 60 %, mala by dosahovať minimálne 40 % a pokiaľ možno by nemala presiahnuť 70 % okrem obdobia počas čistenia miestnosti. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej chemikálie, keď sa podáva týmto spôsobom. Hlodavce by sa mali umiestniť do malých skupín (najviac päť na klietku), pokiaľ sa neočakáva agresívne správanie, a to prednostne v klietkach s pevným dnom s vhodným obohatením prostredia. Ak to je vedecky opodstatnené, zvieratá môžu byť umiestnené samostatne.

▼M8

Príprava zvierat

13. Vo všeobecnosti sa používajú zdravé mladé dospelé samčie zvieratá (staré 8 až 12 týždňov na začiatku pokusu) a náhodne sa rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Každé zviera sa jednotlivo označí humánnou, minimálne invazívnou metódou (napr. krúžkovanie, označenie štítkom, aplikácia mikročipu alebo biometrická identifikácia, nie však skracovanie uší ani prstov) a aklimatizuje sa na laboratórne podmienky v priebehu minimálne piatich dní. Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy spôsobené ich umiestnením. Malo by sa zabrániť krížovej kontaminácii pozitívnou kontrolou a testovanou chemikáliou. Na začiatku štúdie by mali byť rozdiely v hmotnosti zvierat minimálne a nemali by presiahnuť ±20 %.

Príprava dávok

14. Pevné testované chemikálie by sa pred podaním dávky zvieratám mali rozpustiť alebo suspendovať vo vhodných rozpúšťadlách alebo nosičoch alebo primiešať do krmiva alebo pitnej vody. Kvapalné testované chemikálie sa môžu podávať priamo alebo rozriedené pred podaním. V prípade inhalačných expozícií sa testované chemikálie môžu v závislosti od svojich fyzikálno-chemických vlastností podávať ako plyn, výpary alebo tuhé/kvapalné aerosóly. Ak údaje o stabilite nepreukazujú prijateľnosť uskladnenia a nestanovujú vhodné podmienky skladovania, mali by sa používať čerstvo pripravené testované chemikálie.

Podmienky testovania – rozpúšťadlo/nosič

15. Rozpúšťadlo/nosič by nemali vyvolávať toxické účinky pri používaných dávkach a nemali by mať schopnosť chemicky reagovať s testovanou chemikáliou. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by sa malo podporiť referenčnými údajmi uvádzajúcimi ich kompatibilitu. Odporúča sa, aby sa vždy, keď je to možné, najskôr zvážilo použitie vodného rozpúšťadla/nosiča. Príklady bežne používaných kompatibilných rozpúšťadiel/nosičov zahŕňajú vodu, fyziologický roztok, roztok metylcelulózy, roztok sodnej soli karboxymetylcelulózy, olivový olej a kukuričný olej. Ak neexistujú historické alebo zverejnené údaje o kontrolách, z ktorých vyplýva, že zvolené atypické rozpúšťadlo/nosič neindukuje tvorbu štrukturálnych chromozómových aberácií ani iné škodlivé účinky, mala by sa vykonať východisková štúdia s cieľom stanoviť prijateľnosť kontroly s aplikáciou rozpúšťadla/kontroly s nosičom.

Pozitívne kontroly

16. Pokiaľ laboratórium nepreukázalo spôsobilosť pri vykonávaní testu a bežne nepoužívalo test v nedávnej minulosti (napr. počas posledných 5 rokov), vždy sa majú používať zvieratá na súbežné pozitívne kontroly. Ak nie je zahrnutá súbežná pozitívna kontrolná skupina, do každého experimentu by sa mali zahrnúť kontroly hodnotenia (fixované a nezafarbené sklíčka). Možno ich získať tak, že sa do hodnotenia štúdie zahrnú vhodné referenčné vzorky získané a uchované zo samostatného experimentu s pozitívnou kontrolou, ktorý sa vykonáva periodicky (napr. každých 6 až 18 mesiacov) v laboratóriu, kde sa test vykonáva; napríklad počas testovania spôsobilosti a potom pravidelne, podľa potreby.

17. Látky na pozitívnu kontrolu by mali spoľahlivo vyvolať zistiteľný nárast frekvencií buniek so štrukturálnymi chromozómovými aberáciami nad spontánne úrovne. Dávky na pozitívnu kontrolu by sa mali voliť tak, aby boli účinky zjavné, ale aby hodnotiteľovi priamo neodhaľovali identitu kódovaných vzoriek. Príklady látok na pozitívnu kontrolu sú uvedené v tabuľke 1.

▼M8

Tabuľka 1

Príklady látok na pozitívnu kontrolu

Látky [CAS č.] (referenčné č.)
cyklofosfamid (monohydrát) [č. CAS 50-18-0 (č. CAS 6055-19-2)] (9)
cyklohexylamín [č. CAS 108-91-8] (7)
mitomycín C [č. CAS 50-07-7] (6)
monomerický akrylamid [č. CAS 79-06-1] (10)
trietylénmelamín [č. CAS 51-18-3] (8).

Negatívne kontroly

18. Súčasťou každého odberu vzoriek by mali byť zvieratá z negatívnych kontrol ošetrované len s rozpúšťadlom alebo nosičom, s ktorými sa inak zaobchádza rovnako ako s pokusnými skupinami. Ak neexistujú historické alebo zverejnené kontrolné údaje, ktoré by preukazovali, že zvolené rozpúšťadlo/nosič nespôsobuje žiadne chromozómové aberácie ani iné nepriaznivé účinky, zvieratá z neošetrenej kontroly by mali byť súčasťou aj každého času odberu vzoriek na stanovenie prijateľnosti kontroly s nosičom.

POSTUP

Počet zvierat

19. Veľkosti skupín na začiatku štúdie by sa mali stanoviť s cieľom zabezpečiť minimálne 5 samčích zvierat na skupinu. Tento počet zvierat na skupinu sa považuje za dostatočný na zabezpečenie primeranej štatistickej váhy (t. j. na jeho základe sa dá vo všeobecnosti zistiť minimálne zdvojnásobenie frekvencie chromozómových aberácií, ak je úroveň negatívnej kontroly 1,0 % alebo vyššia, s 80 % pravdepodobnosťou na úrovni významnosti 0,05) (3) (11). Ako pomôcku pri bežných požiadavkách na maximálny počet zvierat možno uviesť, že štúdia s dvomi odbermi vzoriek, tromi dávkovými skupinami a so súbežnou negatívnou a pozitívnou kontrolnou skupinou (každá skupina zložená z piatich zvierat) by si vyžadovala 45 zvierat.

Harmonogram aplikácie

20. Testované chemikálie sa obvykle podávajú raz (t. j. ako jednorazové ošetrenie). Môžu sa použiť aj iné dávkovacie schémy, ak sú vedecky opodstatnené.

21. V skupine s najvyššou dávkou sa uskutočnia dva odbery vzoriek po ošetrení. Keďže čas potrebný na príjem a metabolizmus testovaných chemikálií a ich účinky na kinetiku bunkového cyklu môžu ovplyvniť optimálny čas na zistenie chromozómovej aberácie, uskutočňuje sa jeden skorý a jeden neskorý odber vzorky približne 24 a 48 hodín po ošetrení. V prípade iných dávok, ako je najvyššia dávka, by sa skorý odber vzoriek mal vykonať po 24 hodinách od ošetrenia (maximálne v dĺžke bunkového cyklu spermatogónií B, čím sa optimalizuje pravdepodobnosť hodnotenia prvých metafáz po ošetrení), ak neexistuje vedomosť o inom čase odberu vzoriek, ktorý by bol vhodnejší a opodstatnenejší.

22. Môžu sa použiť aj iné časy odberu vzoriek. Napríklad v prípade chemikálií, ktoré vyvolávajú účinky nezávislé od S, môže byť vhodnejší skorší čas odberu vzoriek (t. j. menej ako 24 hodín).

▼M8

23. Môže sa použiť dávkovacia schéma ošetrenia s opakovanou dávkou, napr. v spojení s testom iného sledovaného parametra, pri ktorom sa používa obdobie podávania 28 dní (napr. TM B.58); v prípade ďalších skupín zvierat by sa však vyžadovalo použiť iné časy odberu vzoriek. Vhodnosť takéhoto harmonogramu sa musí vedecky odôvodniť prípad od prípadu.

24. Pred usmrtením sa zvieratám injekčne intraperitoneálne podáva vhodná dávka chemikálie zastavujúcej metafázu (napr. Colcemid® alebo kolchicín). Po vhodnom čase sa následne zo zvierat odoberú vzorky. U myší a potkanov ide o čas približne 3 – 5 hodín.

Úrovne dávok

25. Ak sa vykonáva predbežná štúdia na zistenie rozsahu dávky z dôvodu nedostatku vhodných údajov, ktoré by pomohli pri výbere dávky, mala by sa vykonať v tom istom laboratóriu použitím toho istého druhu, rodu a tej istej schémy ošetrenia ako v hlavnej štúdii a podľa odporúčaní na vykonávanie štúdií na zistenie rozsahu dávky (12). Takáto štúdia by sa mala zamerať na zistenie maximálnej tolerovanej dávky (MTD) definovanej ako dávka, ktorá v porovnaní s časom trvania štúdie vyvolá mierne toxické účinky (napr. nezvyčajné správanie alebo reakcie, mierny úbytok telesnej hmotnosti alebo cytotoxicitu hematopoietického systému), nie však smrť alebo známky bolesti, utrpenia, príp. ťažkostí, ktoré si vyžadujú usmrtenie zvierat (13).

26. Najvyššia dávka sa tiež definuje ako dávka, ktorá spôsobí určité príznaky toxicity v spermatogoniálnych bunkách (napríklad: zníženie pomeru spermatogoniálnej mitózy k prvej a druhej meiotickej metafáze). Toto zníženie by nemalo presiahnuť 50 %.

27. Testované chemikálie s osobitnými biologickými aktivitami pri nízkych netoxických dávkach (ako napríklad hormóny a mitogény) a chemikálie, ktoré vykazujú saturáciu toxikokinetických vlastností, môžu predstavovať výnimku z kritérií na stanovenie dávok a mali by sa hodnotiť prípad od prípadu.

28. Na získanie informácií o odozve na dávku by kompletná štúdia mala zahŕňať negatívnu kontrolnú skupinu (odsek 18) a minimálne tri úrovne dávok vo všeobecnosti oddelené faktorom 2, ale nie vyšším ako 4. Ak testovaná chemikália nevyvoláva toxicitu v štúdii na zistenie rozsahu dávky alebo na základe existujúcich údajov, najvyššia dávka pri jednorazovom podaní by mala byť 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti. Ak však testovaná chemikália spôsobuje toxicitu, maximálna tolerovaná dávka by mala byť najvyššia podávaná dávka a použité úrovne dávky by mali podľa možnosti pokrývať rozsah od maximálnej dávky po dávku, ktorá spôsobuje slabú alebo nespôsobuje žiadnu toxicitu. Ak sa zistí toxicita v cieľovom tkanive (t. j. semenníky) pri všetkých testovaných úrovniach dávok, odporúča sa vykonanie ďalšej štúdie s netoxickými dávkami. Štúdie, ktorých cieľom je podrobnejšie charakterizovať kvantitatívne informácie o odozve na dávku, môžu vyžadovať dodatočné skupiny, ktorým sa budú podávať dávky. V prípade určitých druhov testovaných chemikálií (napr. humánne lieky), na ktoré sa vzťahujú osobitné požiadavky, sa tieto limity môžu líšiť. Ak testovaná chemikália vyvoláva toxicitu, mala by sa zvoliť limitná dávka plus dve nižšie dávky (podľa uvedeného opisu). Limitná dávka pre obdobie podávania v trvaní najmenej 14 dní je 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti na deň a pre obdobie podávania kratšie ako 14 dní je limitná dávka 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti na deň.

▼M8

Podávanie dávok

29. Pri plánovaní skúšky by sa mal zvážiť predpokladaný spôsob expozície ľudí. Preto sa za opodstatnené považuje zvoliť spôsoby expozície napríklad potravou, pitnou vodou, lokálne podkožne, intravenózne, orálne (sondou), inhaláciou alebo implantáciou. V každom prípade by sa mal zvoliť taký spôsob, ktorým sa zaručí adekvátna expozícia cieľového tkaniva. Okrem vedecky odôvodnených prípadov sa vo všeobecnosti neodporúča použitie intraperitoneálnej injekcie, keďže zvyčajne nepredstavuje fyziologicky relevantný spôsob expozície ľudí. Ak je testovaná chemikália primiešaná do potravy alebo pitnej vody, najmä v prípade jednej dávky, treba venovať pozornosť tomu, aby sa medzi spotrebou potravy a vody a odberom vzorky ponechal dostatočný čas, aby sa umožnilo zistenie účinkov (pozri odsek 33). Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže naraz podávať sondou alebo injekciou, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Objem zvyčajne nemá byť vyšší ako 1 ml/100 g telesnej hmotnosti, okrem vodných roztokov, keď sa môže použiť objem najviac 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Použitie väčších objemov ako uvedený objem (pokiaľ to dovoľujú právne predpisy o dobrých životných podmienkach zvierat) by sa malo odôvodniť. Zmeny v testovanom objeme by sa mali minimalizovať tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem vzhľadom na telesnú hmotnosť pri všetkých úrovniach dávky.

Pozorovania

30. Najmenej raz denne by sa mali vykonať všeobecné klinické pozorovania testovaných zvierat a zaznamenať klinické príznaky, najlepšie každý deň v rovnakom čase a so zreteľom na časový interval najintenzívnejších predpokladaných účinkov po podaní dávky. Najmenej dvakrát denne je u všetkých zvierat potrebné sledovať chorobnosť a úmrtnosť. Všetky zvieratá by sa mali odvážiť na začiatku štúdie, aspoň raz za týždeň počas štúdií s opakovanou dávkou, a pri usmrtení. V prípade štúdií, ktoré trvajú aspoň jeden týždeň, by sa malo aspoň raz za týždeň vykonať meranie spotreby potravy. Ak sa testovaná chemikália podáva v pitnej vode, mala by sa spotreba vody odmerať pri každej výmene vody a aspoň raz za týždeň. Zvieratá, ktoré vykazujú neletálne ukazovatele nadmernej toxicity, by mali byť usmrtené pred ukončením testovacieho obdobia (13).

Príprava chromozómov

31. Okamžite po usmrtení sa z jedného alebo oboch semenníkov získavajú suspenzie zárodočných buniek, ktoré sa vystavia hypotonickému roztoku a fixujú sa podľa zavedených protokolov [napr. (2) (14) (15)]. Následne sa bunky nanesú na sklíčka a zafarbia (16) (17). Všetky sklíčka by sa mali okódovať, aby hodnotiteľ nepoznal ich identitu.

Analýza

32. V prípade každého zvieraťa by sa malo ohodnotiť minimálne 200 dobre nanesených metafáz (3) (11). Ak je frekvencia historickej negatívnej kontroly nižšia ako 1 %, malo by sa ohodnotiť viac ako 200 buniek/zviera, aby sa zvýšila štatistická váha (3). Mali by sa používať také metódy farbenia, ktoré umožňujú identifikáciu centroméry.

33. Aberácie chromozómového a chromatidového typu by sa mali zaznamenávať oddelene a klasifikovať podľa poddruhu (zlomy, výmeny). Gapy by sa mali zaznamenávať, ale neberú sa do úvahy pri určovaní, či chemikália vyvoláva významný nárast v rámci incidencie buniek s chromozómovou aberáciou. Postupmi používanými v laboratóriu by sa malo zabezpečiť, aby analýzu chromozómových aberácií vykonávali primerane vyškolení hodnotitelia. Vzhľadom na to, že pri príprave sklíčok často dochádza k zlomom časti

▼M8

buniek v metafáze s následnou stratou chromozómov, vyhodnocované bunky by mali obsahovať najmenej $2n \pm 2$ centromér, kde n je haploidný počet chromozómov pre daný druh.

34. Napriek tomu, že účelom testu je zistiť štrukturálne chromozómové aberácie, je dôležité zaznamenať frekvencie polyploidných buniek a buniek s endoreduplikovanými chromozómami, ak sa tieto udalosti spozorujú (pozri odsek 44).

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Spracovanie výsledkov

35. Údaje o jednotlivých zvieratách by sa mali uvádzať v tabuľkovej forme. Pre každé zviera by sa mal hodnotiť počet buniek so štrukturálnymi chromozómovými aberáciami a počet chromozómových aberácií na bunku. Aberácie chromatidového a chromozómového typu klasifikované podľa poddruhov (zlomy, výmeny) by mali byť uvedené oddelene spolu s ich počtom a frekvenciami výskytu v prípade experimentálnych a kontrolných skupín. Gapy sa zaznamenávajú oddelene. Frekvencia gapov sa zaznamenáva, ale vo všeobecnosti sa nezahŕňa do analýzy celkovej frekvencie štrukturálnych chromozómových aberácií. Uvádza sa percentuálny podiel polyploidie a buniek s endoreduplikovanými chromozómami, ak boli pozorované.

36. Treba vykazovať údaje o toxicite a o klinických príznakoch (podľa odseku 30).

Kritériá prijateľnosti

37. Prijateľnosť testu určujú tieto kritériá:

— súbežná negatívna kontrola je v súlade so zverejnenými normami pre historické údaje negatívnych kontrol, pri ktorých sa vo všeobecnosti očakáva, že budú predstavovať > 0 % a $\leq 1{,}5$ % buniek s chromozómovými aberáciami, a s historickými údajmi laboratória o kontrolách, ak sú k dispozícii (pozri odseky 10 a 18),

— súbežné pozitívne kontroly vyvolávajú odozvy, ktoré sú v súlade so zverejnenými normami pre historické údaje z pozitívnych kontrol alebo s historickými údajmi laboratória z pozitívnych kontrol, ak sú k dispozícii, a v porovnaní s negatívnou kontrolou vedú k štatisticky významnému nárastu (pozri odseky 17, 18),

— analyzoval sa adekvátny počet buniek a dávok (pozri odsek 28 a 32),

— kritériá výberu najvyššej dávky sú v súlade s kritériami opísanými v odsekoch 25 a 26.

38. Ak sa pozoruje mitóza aj meióza, pomer spermatogoniálnych mitóz k prvej a druhej meiotickej metafáze by sa mal stanoviť ako indikátor cytotoxicity v prípade všetkých ošetrených zvierat a zvierat z negatívnych kontrol pri celkovej vzorke 100 deliacich sa buniek na zviera. Ak sa pozoruje len mitóza, mitotický index sa stanovuje pre najmenej 1 000 buniek na jedno zviera.

Hodnotenie a interpretácia výsledkov

39. Na zabezpečenie dostatočných údajov na analýzu vzťahu medzi dávkou a odozvou treba analyzovať najmenej tri skupiny ošetrené podaním dávky.

▼**M8**

40. Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, testovaná chemikália sa pokladá za jednoznačne pozitívnu, ak:

— najmenej jedna z testovaných dávok vykazuje štatisticky významný nárast v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

— nárast aspoň pri jednom čase odberu vzoriek súvisí s dávkou a

— niektorý z týchto výsledkov je mimo prijateľného rozsahu údajov z negatívnych kontrol alebo distribúcie historických údajov z negatívnych kontrol laboratória (napr. 95 % regulačné medze Poissonovho rozdelenia), ak sú k dispozícii.

Testovaná chemikália sa vtedy považuje za schopnú vyvolať chromozómové aberácie v spermatogoniálnych bunkách testovaných zvierat. Odporúčania týkajúce sa najvhodnejších štatistických metód možno takisto nájsť aj v literatúre (11) (18). V použitých štatistických testoch by sa malo zviera posudzovať ako pokusná jednotka.

41. Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, testovaná chemikália sa pokladá za jednoznačne negatívnu, ak:

— ani jedna z testovaných dávok nevykazuje štatisticky významný nárast v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

— neexistuje nárast súvisiaci s dávkou pri žiadnej experimentálnej podmienke a

— všetky výsledky sú v rámci prijateľného rozsahu údajov negatívnych kontrol alebo historických údajov negatívnych kontrol laboratória (napr. 95 % regulačnej medze Poissonovho rozdelenia), ak sú k dispozícii.

Testovaná chemikália sa vtedy považuje za neschopnú vyvolať chromozómové aberácie v spermatogoniálnych bunkách pokusných zvierat. Odporúčania týkajúce sa najvhodnejších štatistických metód možno takisto nájsť aj v literatúre (11) (18). Negatívnym výsledkom sa nevylučuje možnosť, že chemikálie môžu v neskorších vývojových fázach, ktoré nie sú predmetom štúdie, vyvolávať chromozómové aberácie alebo génové mutácie.

42. Neexistuje požiadavka na overenie jasnej pozitívnej alebo negatívnej odozvy.

43. Ak odozva nie je jednoznačne negatívna ani pozitívna a má sa pomôcť pri stanovení biologickej relevantnosti výsledku (napr. slabé alebo hraničné zvýšenie), údaje by sa mali vyhodnotiť na základe odborného posúdenia a/alebo ďalšieho skúmania pomocou existujúcich experimentálnych údajov, napríklad posúdením, či je pozitívny výsledok mimo prijateľného rozsahu údajov negatívnych kontrol alebo historických údajov negatívnych kontrol laboratória (19).

44. V zriedkavých prípadoch, dokonca aj po ďalších skúmaniach, nemusí byť na základe daného súboru údajov možné dospieť k záveru o pozitívnych alebo negatívnych výsledkoch, a preto sa takéto údaje budú považovať za nejednoznačné.

45. Nárast počtu polyploidných buniek môže naznačovať, že testovaná chemikália má potenciál brzdiť mitotické procesy a indukovať numerické chromozómové aberácie (20). Nárast počtu buniek s endoreduplikovanými chromozómami môže naznačovať, že testovaná chemikália má potenciál brzdiť progres bunkového cyklu (21) (22), ktorý predstavuje iný mechanizmus indukcie numerických zmien chromozómov ako brzdenie mitotických procesov (pozri odsek 2). Preto by sa incidencia polyploidných buniek a buniek s endoreduplikovanými chromozómami mala zaznamenávať oddelene.

▼**M8**

Správa o teste

46. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Zhrnutie.

Testovaná chemikália:

— zdroj, číslo šarže, konečný dátum použitia, ak sú tieto informácie k dispozícii,

— stabilita testovanej chemikálie, ak je známa,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle, ak je známa,

— meranie pH, osmolality a zrazeniny v kultivačnom médiu, do ktorého bola pridaná testovaná chemikália.

Jednozložková látka:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, CAS číslo, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt atď., ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Príprava testovanej chemikálie:

— zdôvodnenie voľby nosiča,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle/nosiči,

— príprava potravy, pitnej vody alebo inhalačných prípravkov,

— analytické stanovenie prípravkov (napr. stabilita, homogenita, nominálne koncentrácie) v prípade, že sa vykonávajú.

Testované zvieratá:

— použitý druh/kmeň a zdôvodnenie jeho použitia,

— počet a vek zvierat,

— zdroj, podmienky umiestnenia, potrava atď.,

— metóda na jedinečnú identifikáciu zvierat,

— v prípade krátkodobých štúdií: hmotnosť jednotlivých zvierat na začiatku a na konci testu; v prípade štúdií trvajúcich viac ako jeden týždeň: hmotnosť jednotlivých zvierat počas štúdie a konzumácia potravy. Mal by sa zahrnúť rozsah telesnej hmotnosti, stredná hodnota a štandardná odchýlka pre každú skupinu.

Podmienky testovania:

— údaje z pozitívnych a negatívnych (rozpúšťadlo/nosič) kontrol,

▼**M8**

— údaje zo štúdie na zistenie rozsahu, ak sa vykonala,

— odôvodnenie výberu úrovne dávky,

— odôvodnenie cesty podania,

— podrobné údaje o príprave testovanej chemikálie,

— podrobné údaje o podávaní testovanej chemikálie,

— zdôvodnenie času utratenia,

— metódy merania toxicity pre zvieratá vrátane, ak sú k dispozícii, histopatologických alebo hematologických analýz, ako aj frekvencia pozorovaní zvierat a váženia ich telesnej hmotnosti,

— metódy overovania, či sa testovaná chemikália dostala do cieľového tkaniva alebo hlavného obehu v prípade negatívnych výsledkov,

— skutočná dávka (mg/kg telesnej hmotnosti/deň) vypočítaná z koncentrácie testovanej chemikálie (ppm) v potrave/pitnej vode a zo spotreby potravy/pitnej vody, ak sa uplatňuje,

— podrobné informácie o kvalite potravy a vody,

— podrobný opis harmonogramu ošetrovania a harmonogramu odberu vzoriek a zdôvodnenie ich voľby,

— metóda usmrtenia,

— metóda analgézie (v prípade použitia),

— postupy izolácie tkanív,

— identita chemikálie zastavujúcej metafázu, jej koncentrácia a trvanie ošetrenia,

— metódy prípravy sklíčok,

— kritériá na hodnotenie aberácií,

— počet analyzovaných buniek na jedno zviera,

— kritériá na hodnotenie štúdií ako pozitívne, negatívne alebo nejednoznačné.

Výsledky:

— stav zvieraťa pred testovaním a počas obdobia testovania vrátane toxických príznakov,

— hmotnosť tela a orgánov pri utratení (ak boli vykonané viaceré ošetrenia, telesné hmotnosti počas schémy ošetrenia),

— príznaky toxicity,

— mitotický index,

— pomer spermatogoniálnej mitózy k prvej a druhej meiotickej metafáze alebo iný dôkaz expozície cieľového tkaniva,

— typ a počet odchýlok uvádzaný samostatne na každé zviera,

— celkový počet aberácií na skupinu s priemerom a štandardnou odchýlkou,

▼**M8**

— počet buniek s aberáciami na skupinu s priemerom a štandardnou odchýlkou,

— vzťah medzi dávkou a odozvou, ak je možné ho určiť,

— použité štatistické analýzy a metódy,

— súbežné údaje z negatívnych kontrol,

— historické údaje z negatívnych kontrol, priemery, štandardné odchýlky a interval spoľahlivosti 95 % (ak je dostupný) alebo publikované historické údaje z negatívnych kontrol používané pri prijateľnosti výsledkov testu,

— súbežné údaje o pozitívnych kontrolách,

— zmeny v ploídii, ak sa pozorovali, vrátane frekvencie polyploidie a/alebo endoreduplikovaných buniek.

Rozbor výsledkov

Záver

LITERATÚRA

(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, ID (1984). *Cytogenetic Tests in Mammals.* In: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*. Ed. S. Venitt a J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, s. 275-306.

(3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. a 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, s. 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, s. 477-484.

(7) Cattanach, B.M., a Pollard C.E. (1971). *Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse*, Mutation Res., 12, 472-474.

(8) Cattanach, B.M., and Pollard 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.), Organizácia pre hospodársku spoluprácu a rozvoj, Paríž.

(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., a 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. správa Part I revised*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 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, s. 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.

▼M8

Dodatok

VYMEDZENIE POJMOV

Aneuploidia: akákoľvek odchýlka od bežného diploidného (alebo haploidného) počtu chromozómov vo forme jedného alebo viacerých chromozómov, nie však vo forme celého(-ých) súboru(-ov) chromozómov (polyploidia).

Centroméra: oblasť(-ti) chromozómu, v ktorej(-ých) sa vlákna deliaceho vretienka pripájajú k chromozómu počas delenia bunky a ktorá(-é) umožňuje(-ú) riadny pohyb dcérskych chromozómov k pólom dcérskych buniek.

Chemikália: látka alebo zmes.

Chromozómová diverzita: diverzita tvaru (napr. metacentrický, akrocentrický) a veľkosti chromozómov.

Aberácia chromatidového typu: štrukturálne chromozómové poškodenie prejavujúce sa ako zlom jednej z chromatíd alebo zlom a opätovné spojenie medzi chromatídami.

Aberácia chromozómového typu: štrukturálne poškodenie chromozómu prejavujúce sa ako zlom alebo zlom a opätovné spojenie oboch chromatíd na rovnakej strane.

Klastogén: každá chemikália, ktorá spôsobuje štrukturálne chromozómové aberácie v populáciách buniek alebo organizmov.

Gap: achromatická lézia menšia ako šírka jednej chromatídy s minimálnym posunutím chromatíd.

Genotoxický: všeobecný výraz, ktorý zahŕňa všetky typy poškodenia DNA alebo chromozómov vrátane zlomov, delécií, aduktov, modifikácií a prepojení nukleotidov, prestavieb, mutácií, chromozómových aberácií a aneuploidie. Nie všetky typy genotoxických účinkov majú za následok mutácie alebo trvalé poškodenie chromozómov.

Mitotický index (MI): pomer buniek v metafáze vydelený celkovým počtom buniek pozorovaných v populácii buniek; náznak stupňa šírenia tejto populácie.

Mitóza: delenie bunkového jadra, ktoré sa zvyčajne delí na profázu, prometafázu, metafázu, anafázu a telofázu.

Mutagénny: produkujúci dedičnú zmenu sekvencie(-í) párov báz DNA v génoch alebo štruktúry chromozómov (chromozómové aberácie).

Numerické abnormality: zmena v počte chromozómov v porovnaní s bežným počtom charakteristickým pre použité zvieratá.

Polyploidia: násobok haploidného chromozómového čísla (n) odlišného od diploidného čísla (t. j. $3n$, $4n$ atď.).

Štrukturálna aberácia: zmena chromozómovej štruktúry rozpoznateľná mikroskopickým skúmaním metafázového štádia delenia buniek, pozorovaná ako delécie a fragmenty, výmeny.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

UVCB: látka neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

▼M7

▼B

B.25. DEDIČNÁ TRANSLOKÁCIA U MYŠÍ

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Test dedičnej translokácie u myší zisťuje štrukturálne a numerické chromozómové zmeny v cicavčích zárodočných bunkách po objavení sa v prvej generácii potomkov. Zistené typy chromozómových zmien sú recipročné translokácie a chromozómové straty v prípade, že je obsiahnuté samičie potomstvo. Nosiči translokácie a XO-samice vykazujú zníženú plodnosť, ktorá sa používa na selekciu F_1 potomstva pre cytogenetickú analýzu. Úplná neplodnosť je spôsobená istými typmi translokácií (X-autozóm, a c-t typ). Translokácie sa cytogeneticky pozorujú v meiotických bunkách v diakinéze metafázy I samčích jedincov, a to buď F_1 samcov, alebo samčieho potomstva F_1 samíc. XO-samice sa cytogeneticky identifikujú prostredníctvom prítomnosti iba 39 chromozómov v mitózach kostnej drene.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Príprava

Testované chemikálie sa rozpustia v fyziologickom roztoku. Ak sú nerozpustné, rozpúšťajú sa alebo rozsuspendujú vo vhodnom nosiči. Využívajú sa čerstvo pripravené roztoky testovanej zlúčeniny. Ak je na uľahčenie dávkovania použitý nosič, nesmie vzájomne reagovať s testovanou zlúčeninou alebo spôsobovať toxické efekty.

Spôsob podávania

Orálna intubácia alebo intraperitoneálna injekcia sú zvyčajnými spôsobmi podávania. Vhodné sú aj iné spôsoby podávania.

Pokusné zvieratá

Pre prípad rozmnožovania a cytologického overovania sa pokusy vykonávajú s myšou. Nevyžaduje sa žiaden špecifický kmeň. Priemerná veľkosť vrhu kmeňa by však mala byť väčšia ako osem a mala by byť relatívne stála.

Používajú sa zdravé a pohlavne zrelé zvieratá.

▼B

Počet zvierat

Nevyhnutný počet zvierat závisí od frekvencie spontánnych translokácií a na získanie pozitívnych výsledkov sa vyžaduje minimálna rýchlosť indukcie.

Test sa zvyčajne vykonáva analýzou samčieho F_1 potomstva. Pre jednu dávkovú skupinu by sa malo testovať aspoň 500 samčích F_1 potomkov, 300 samcov a 300 samičiek sa požaduje v prípade, že sa zahŕňa samičie F_1 potomstvo.

Použitie negatívnej a pozitívnej kontroly

Dostupné by mali byť zodpovedajúce kontrolné dáta odvodené zo súbežnej a historickej kontroly. V prípade, že na základe súčasných pokusov prevedených v tom istom laboratóriu sú k dispozícii prijateľné výsledky pozitívnej kontroly, tieto výsledky sa môžu použiť miesto súbežnej pozitívnej kontroly.

Úrovne dávok

Testuje sa jedna úroveň dávky, zvyčajne najvyššia dávka spojená s produkciou minimálnych toxických efektov, ale bez vplyvu na reprodukčné správanie alebo prežívanie. Na zabezpečenie vzťahu dávky/efekt sa požadujú ďalšie dve nižšie dávky. Pre netoxické chemikálie by sa malo použiť vystavenie maximálnej dosiahnuteľnej dávke.

Postup

Ovplyvňovanie a párenie

K dispozícii sú dva harmonogramy ovplyvňovania. Jednorazové podávanie testovanej látky sa používa najčastejšie. Taktiež sa môže použiť podávanie testovanej látky v siedmy deň každého týždňa počas 35 dní. Počet párení nasledujúcich po ovplyvnení sa riadi harmonogramom ovplyvňovania a mal by zabezpečiť, že sa zachytia všetky štádiá zárodočných buniek. Na konci obdobia párenia sa samičky jednotlivo umiestnia do klietok. Keď samičky vrhnú, zaznamená sa dátum, veľkosť vrhu a pohlavie potomstva. Všetko samčie potomstvo sa odstaví a všetky samičie potomstvá sa odstránia, pokiaľ sa nepoužijú v pokuse.

Testovanie translokačnej heterozygozity

Používa sa jedna z dvoch možných metód:

— testovanie plodnosti F_1 potomstva a následné overenie možných nosičov translokácií pomocou cytogenetickej analýzy,

— cytogenetická analýza všetkých samčích F_1 potomkov bez predchádzajúcej selekcie testom plodnosti.

a) Testovanie plodnosti

Znížená plodnosť F_1 jedinca sa môže stanoviť pozorovaním veľkosti vrhu a/alebo analýzou obsahov maternice samičích krížencov.

Pre každý myší kmeň sa musia stanoviť kritériá pre určovanie normálnej a zníženej plodnosti.

▼B

Pozorovanie veľkosti vrhu: testované F_1 samce sa umiestnia jednotlivo do klietok so samičkami z toho istého pokusu alebo kolónie. Klietky sa prezerajú denne počnúc po 18. dňoch od párenia. Veľkosť vrhu a pohlavie F_2 potomstva sa zaznamená pri narodení a vrhy sú následne zničené. Ak sa testujú samičie F_1 potomstvá, F_2 potomstvá malých vrhov sa ponechajú pre ďalšie testovanie. Nosiči samičích translokácií sa overia cytogenetickou analýzou translokácie pre ich každého samčieho potomka. XO-samičky sa rozpoznajú prostredníctvom zmeny v pohlavnom pomere spomedzi ich potomstva od hodnoty 1: 1 na 1: 2 samcov vs. samíc. V nasledujúcom kroku postupu sa F_1 zvieratá vylúčia z ďalšieho testovania v prípade, že prvý F_2 vrh dosiahne alebo prekročí predurčenú normálnu hodnotu. Inak sa pozoruje druhý alebo tretí F_2 vrh.

F_1 zvieratá, ktoré sa po pozorovaní až do tretieho vrhu nemôžu klasifikovať ako normálne, sa buď ďalej testujú analýzou obsahu maternice samičích krížencov, alebo sú priamo podrobené cytogenetickej analýze.

Analýza maternicového obsahu: Zníženie veľkosti vrhu nosičov translokácií je spôsobené odumretím embryí, takže vysoký počet mŕtvych implantátov naznačuje prítomnosť translokácií u testovaného zvieraťa. Každý testovaný samec F_1 sa pári s dvomi alebo tromi samicami. Počatie sa stanovuje denne ranným vyšetrením vaginálnej zátky. Samice sa usmrtia po uplynutí 14 až 16 dní a zaznamenajú sa žijúce a mŕtve implantáty, ktoré sa nachádzajú v ich maternici.

b) Cytogenetická analýza

Preparáty semenníkov sa vytvoria pomocou techniky sušenia na vzduchu. Nosiči translokácií sa určia pomocou prítomnosti multivalentných konfigurácií počas diakinézy metafázy I v primárnych spermatocytoch. Pozorovania aspoň dvoch buniek s multivalentnými vzťahmi sú základom požadovaného dôkazu, že testované zviera je nosičom translokácie.

Ak sa nevykonala selekcia vrhu, všetky samce F_1 sa vyšetria cytogeneticky. Mikroskopicky sa musí vyhodnotiť minimálne 25 buniek v štádiu diakinézy metafázy I na jedného samca. Pri samčekoch F_1 s malými semenníkmi a prerušením meiózy pred diakinézou alebo pri samičkách F_1 s podozrením na XO sa vyžaduje vyšetrenie mitotických metafáz v spermatogóniách alebo kostnej dreni. Prítomnosť nezvyčajne dlhého a/alebo krátkeho chromozómu v každej z 10 buniek je dôkazom určitej translokácie samčej sterility (c-t typ). Niektoré translokácie X-autozómu, ktoré spôsobujú samčiu sterilitu, sa dajú identifikovať iba prúžkovacou analýzou mitotických chromozómov. Prítomnosť 39 chromozómov vo všetkých 10 mitózach je dôkazom pre XO stav samice.

2. **ÚDAJE**

Údaje sa prezentujú vo forme tabuliek.

Pre každé obdobie párenia sa zaznamená priemerná veľkosť vrhu a pomer pohlaví z krížení rodičov pri narodení a pri odstavení.

▼B

Na potvrdenie plodnosti zvierat F_1 generácie sa uvádza priemerná veľkosť vrhu všetkých normálnych párení a veľkosť každého jednotlivého vrhu nosičov translokácie F_1. Na analýzu obsahu maternice sa uvádza priemerný počet žijúcich a mŕtvych implantátov pri normálnych pároniach a jednotlivé počty žijúcich a mŕtvych implantátov pri každom párení nosičov F_1 translokácie.

Na cytogenetickú analýzu diakinézy metafázy I sa pre každého nosiča translokácie uvádza počet typov multivalentných konfigurácií a celkový počet buniek.

Pre sterilných F_1 jedincov sa uvádza celkový počet párení a trvanie obdobia párenia. Uvedená je hmotnosť semenníkov a podrobnosti cytogenetickej analýzy.

Pre XO samice je uvedená priemerná veľkosť vrhu, pomer pohlaví v F_1 potomstve a výsledky cytogenetickej analýzy.

Ak je to možné, nosiči F_1 translokácií sa vopred selektujú testmi plodnosti. Tabuľky musia zahŕňať informácie o tom, pri koľkých z nich sa potvrdila translokačná heterozygozita.

Uvádzané sú údaje z experimentov s negatívnou a pozitívnou kontrolou.

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

V prípade, že je to možné, správa z testu obsahuje tieto informácie:

— kmeň myší, vek zvierat, hmotnosť ovplyvnených zvierat,

— počet rodičovských zvierat každého pohlavia v experimentálnej a kontrolnej skupine,

— podmienky testu, podrobný opis ovplyvnenia, úrovne dávok, rozpúšťadlá, harmonogram párenia,

— počet a pohlavie potomkov na samicu, počet a pohlavie potomkov zohraných na analýzu translokácie,

— čas a kritériá analýzy translokácie,

— ak je to možné, počet a podrobný opis nosičov translokácie zahŕňajúci údaje o chove a údaje o obsahu maternice,

— cytogenetické metódy a podrobnosti o mikroskopickej analýze, pokiaľ možno s obrázkami,

— štatistické vyhodnotenie,

— diskusiu o výsledkoch,

— interpretáciu výsledkov.

▼B

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

▼B

B.26. **TEST SUBCHRONICKEJ ORÁLNEJ TOXICITY 90-DŇOVÁ ŠTÚDIA ORÁLNEJ TOXICITY U HLODAVCOV/TEST V OPAKOVANÝCH DÁVKACH**

1. **METÓDA**

Táto testovacia metóda subchronickej toxicity je kópia OECD TG 408 (1998).

1.1. ÚVOD

Stanovenie a vyhodnotenie charakteristík toxicity danej chemickej látky, zistenie subchronickej orálnej toxicity metódou opakovaných dávok sa dá vykonať až po získaní východiskových informácií o toxicite z krátkodobých alebo 28-dňových testov. Táto 90-dňová štúdia poskytuje informácie o možných rizikách ohrozenia zdravia, ktoré pravdepodobne vznikajú vplyvom opakovaného pôsobenia počas dlhšieho časového obdobia, ktoré zahŕňa post-dojčiace, dospievanie a vývoj až do dospelosti. Štúdia poskytuje informácie o závažných toxických účinkoch, indikuje zasiahnuté orgány a možnosti akumulácie a umožňuje odhadnúť stupeň pôsobenia nezistených škodlivých účinkov, ktorý sa dá následne využiť pri výbere objemu dávok na dlhodobé štúdie a pri stanovení bezpečnostných kritérií ohľadom ich pôsobenia na človeka.

Táto metóda kladie dodatočný dôraz na neurologické koncové body a ponúka indikáciu imunologických a reprodukčných účinkov. Taktiež sa v nej zdôrazňuje nutnosť dôkladných klinických pozorovaní zvierat s cieľom získať čo najväčšie množstvo informácií. Táto štúdia umožňuje, aby sa pri identifikácii chemických látok bral do úvahy aj ich potenciál vplývať na orgány neurotoxickými, imunologickými účinkami a taktiež účinkami na reprodukciu, z čoho vyplýva následné hĺbkové skúmanie.

Pozri Všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Dávka: množstvo podávanej testovanej látky. Dávka je vyjadrená ako hmotnosť (g, mg) alebo ako hmotnosť testovanej látky na jednotkovú hmotnosť testovaného zvieraťa (napr. mg/kg) alebo konštantné dietetické koncentrácie (ppm).

Dávkovanie: všeobecný pojem, ktorý zahŕňa dávku, jej frekvenciu a trvanie.

NOAEL: skratka pre stupeň nezistených škodlivých účinkov, je najvyššou možnou dávkou, pri ktorej sa neobjavili žiadne škodlivé nálezy v súvislosti s liečbou.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka sa podáva denne niekoľkým skupinám pokusných zvierat vo zvýšených dávkach, každá skupina zvierat dostáva určitú dávku počas 90 dní. V priebehu tohto obdobia sa na zvieratách dôkladne skúmajú príznaky toxicity. Zvieratá, ktoré počas testu uhynú, sú následne pitvané a taktiež zvieratá, ktoré prežijú, sú na záver testu usmrtené a podrobené pitve.

▼B

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Príprava zvierat**

Na test sa použijú zdravé zvieratá, ktoré sa aspoň päť dní aklimatizovali na laboratórne podmienky a ktoré neboli predtým podrobené žiadnym pokusom. Druh, rod, pôvod, pohlavie, váhu a/alebo vek zvierat sú presne stanovené. Do skupín budú zvieratá zadelené náhodným výberom a na takomto princípe sa budú vyberať aj na kontrolu. Klietky sa umiestnia v takom poradí, aby sa možné účinky vzhľadom na umiestnenie klietky minimalizovali. Každému zvieraťu sa pridelí identifikačné číslo.

1.4.2. **Príprava dávok**

Testovaná látka sa podáva cez trubicu priamo do žalúdka alebo v potrave alebo v pitnej vode. Metóda orálneho podávania závisí od účelu štúdie a fyzikálno-chemických vlastností testovanej látky.

Látka sa podáva buď rozpustená alebo rozptýlená vo vhodnom materiáli. Odporúča sa, ak je to potrebné, uvažovať o použití vodných roztokov/suspenzií ako prvých v poradí, následne o roztokoch/emulziách v oleji (napr. kukuričnom) a až potom o roztokoch v iných materiáloch. Pri iných materiáloch ako voda je vhodné zistiť ich toxickú charakteristiku. Počas podávania testovanej látky je nevyhnutné zaistiť jej stálosť.

1.4.3. **Podmienky testu**

1.4.3.1. *Pokusné zvieratá*

Najvhodnejším zvieraťom je potkan, hoci sa môžu použiť aj iné hlodavce, napr. myši. Bežne sa používajú laboratórne druhy mladých zdravých dospelých zvierat. Samičky musia byť neplodné a neoplodnené. Dávkovanie musí začať čo najskôr po odstavení mláďat a skôr než zvieratá dovŕšia deväť týždňov. Na začiatku štúdie váhové odchýlky u zvierat sú minimálne a neprevyšujú ± 20 % priemernej váhy oboch pohlaví. Ak sa táto štúdia uskutočňuje ako predbežná k dlhodobej štúdii chronickej toxicity, v oboch štúdiách by sa mali použiť zvieratá toho istého druhu.

1.4.3.2. *Množstvo a pohlavie*

Na každej úrovni podávania dávok by sa malo použiť aspoň 20 zvierat (10 samičiek a 10 samčekov). Ak sa medzitým naplánuje usmrtenie nejakých zvierat, mal by sa pred ukončením štúdie počet o tieto doplniť do pôvodného množstva pred usmrtením zvierat. Na základe doposiaľ získaných znalostí o danej chemickej látke alebo inej príbuznej látke sa odporúča po uplynutí testovaného obdobia venovať pozornosť, vrátane ďalšej satelitnej skupiny 10 zvierat (po piatich z každého pohlavia), kontrole a pozorovaniam skupiny s najvyššími dávkami, vratnosti a trvácnosti akýchkoľvek toxických účinkov. Trvanie tohto obdobia sa presne stanoví po uplynutí expozície s ohľadom na spozorované účinky.

▼B

1.4.3.3. *Úrovne dávkovania*

Bolo by vhodné absolvovať tento test aspoň na troch úrovniach so súbežnou kontrolou, okrem prípadov, v ktorých prebieha limitný test (pozri 1.4.3.4). Výšky dávkovania sa môžu zakladať na výsledkoch opakovaného dávkovania alebo mnohých zisťovacích štúdií a je potrebné prihliadať aj na jestvujúce toxikologické a toxickokinetické údaje, ktoré sú o testovanej látke alebo príbuzných látkach k dispozícii. Ak to nie je obmedzené fyzikálno-chemickou podstatou alebo biologickými účinkami testovanej látky, najvyššia hladina dávky by sa mala vybrať s cieľom vyvolať toxicitu, ale nie smrteľné alebo kruté utrpenie. Potom by sa malo prejsť na zostupnú postupnosť objemu dávkovania so zámerom preukázať, že každá dávka má za následok účinok a že nebol spozorovaný škodlivý účinok pri najnižšej úrovni dávkovania (NOAEL). Na stanovenie zostupného dávkovania sú optimálne dvoj- až trojnásobné intervaly a pri štvrtej testovanej skupine sa odporúča dodržať veľmi veľké intervaly (napr. viac ako faktor 6-10) medzi dávkami.

Kontrolná skupina by mala byť neexponovaná skupina alebo skupina na kontrolu nosiča, ak sa nosič používa pri podávaní testovanej látky. Bez ohľadu na aplikovanie testovanej látky, so zvieratami v kontrolnej skupine by sa malo zaobchádzať rovnakým spôsobom ako s tými, ktoré sú v testovanej skupine. Ak sa použije nosič, kontrolná skupina dostane tento v čo najväčšom množstve. Ak sa testovaná látka podáva v potrave a spôsobuje redukciu príjmu potravy, potom je vhodné použiť dve súčasne kŕmené kontrolné skupiny na odlíšenie redukcie zapríčinenej nechutenstvom alebo toxikologickými zmenami testovanej vzorky.

Náležitá pozornosť by sa mala venovať nasledujúcim vlastnostiam nosiča a ostatným aditívam: účinky na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo retencia testovanej látky; účinky na chemické vlastnosti testovanej látky, ktoré môžu pozmeniť jej toxické vlastnosti a vplyvy na spotrebu krmiva a vody alebo na stav výživy zvierat.

1.4.3.4. *Limitný test*

Ak sa počas testu pri jednej úrovni dávkovania, s dávkami aspoň 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň a pri dodržaní postupov opísaných v tejto štúdii, nezískajú žiadne údaje o škodlivých účinkoch a ak toxicita nedosiahne očakávanú úroveň na základe údajov na štrukturálne príbuzné látky, potom vôbec nie je potrebné uvažovať o komplexnej štúdii s tromi úrovňami. Limitný test sa nepoužije v prípadoch, ak pôsobenie látky na človeka indikuje potrebu vyššej úrovne dávkovania.

1.5. POSTUP

1.5.1. **Podávaná dávka**

Zvieratám sa podáva dávka s testovanou látkou denne počas siedmich dní v týždni po obdobie 90 dní. Použitie každého iného režimu dávkovania, napr. päť dní v týždni, musí byť opodstatnené. Ak je testovaná látka podávaná trubicou, musí sa toto vykonať v jednej dávke pre zviera, s použitím žalúdočnej trubice alebo vhodnej intubačnej kanyly. Maximálny objem kvapaliny, ktorý môže byť naraz podaný, závisí od veľkosti testovaného zvieraťa. Objem nesmie presiahnuť 1 ml/100 g telesnej hmotnosti, s výnimkou prípadu vodných roztokov, kde sa môže použiť dávkovanie 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Variabilita testovaných objemov sa zminimalizuje nastavením/adjustáciou/koncentrácií s cieľom zaistenia konštantných objemov vo všetkých úrovniach dávkovania. S výnimkou dráždivých alebo žieravých látok, ktoré za normálnych okolností preukazujú zhoršujúci sa účinok vo vysokých koncentráciách, variabilita/odlišnosti/testovaných objemov sa minimalizuje určením koncentrácií tak, aby sa zaistil konštantný objem na všetky hladiny dávkovania.

▼B

Pre látky, ktoré sú podávané spolu s potravou alebo pitnou vodou, je dôležité zabezpečiť, aby množstvo obsiahnutých testovaných látok neinterferovalo s normálnou nutričnou hodnotou alebo vodnou rovnováhou. Ak je testovaná látka podávaná v potrave, môže sa použiť buď konštantná stravná koncentrácia, (ppm) alebo konštantná úroveň dávkovania s ohľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa; alternatívne používanie je potrebné špecifikovať. Dávka látok podávaných cez trubicu sa musí podávať každý deň v rovnakom čase a musí sa regulovať tak, aby sa udržiavala konštantná úroveň dávkovania so zreteľom na telesnú hmotnosť zvieraťa. Ak sa uplatňuje 90-dňová štúdia ako predbežná k dlhodobej štúdii chemickej toxicity, je potrebné použiť rovnakú potravu v oboch štúdiách.

1.5.2. **Pozorovania**

Doba pozorovania by mala trvať aspoň 90 dní. Zvieratá v satelitných skupinách, určené podľa plánu na kontrolné pozorovania, by na určitý čas nemali byť vystavené pôsobeniu testovanej látky, aby sa detegovala stálosť alebo aby sa zotavili z toxických účinkov.

Všeobecné klinické pozorovania by sa mali vykonávať najmenej raz denne, najmä v rovnakom čase každý deň, berúc do úvahy vrchol doby predvídaných účinkov po dávkovaní. Klinické podmienky zvierat musia byť zaznamenané. Všetky zvieratá sa podrobia kontrole patologických zmien a mortality najmenej dvakrát denne, obvykle na začiatku a konci každého dňa.

Detailné klinické pozorovania na všetkých zvieratách vykonáme najmenej raz pred prvou expozíciou (aby sa umožnilo porovnanie v rámci subjektov) a raz za týždeň po expozícií. Tieto pozorovania sa vykonávajú mimo domu, klietky, radšej v štandardnej aréne a v podobnom čase pri každej príležitosti. Musia byť pozorne zaznamenané, s použitím hodnotiaceho systému explicitne definovaného testovacím laboratóriom. Je potrebné minimalizovať odlišnosti v podmienkach pozorovaní. Pozorované znaky zahŕňajú, ale nie sú limitované, zmeny na koži, kožušine, očiach, slizniciach, výskyt sekrécie a vylučovania autonómnej aktivity (ako napr. slzenie, piloerekcia, veľkosť zreníc, neobvyklé dýchanie). Zmeny v chôdzi, držaní tela a odozve na zaobchádzanie, ako aj prítomnosť kónických alebo napätých pohybov, stereotypov (napr. opakované točenie sa), prílišné ošetrovanie sa alebo zvláštne správanie (napr. chôdza dozadu, sebaznetvorenie) musia byť tiež zaznamenané.

Oftalmologické vyšetrenia, pri ktorých sa používajú oftalmoskopy alebo iné ekvivalentné vhodné zariadenia, sa vykonávajú pred podaním testovanej látky a po ukončení štúdie najlepšie na všetkých zvieratách, ale najmenej v skupine s vysokou dávkou a v kontrolnej skupine. Ak sa zistia zmeny na očiach, musia byť všetky zvieratá otestované.

Ku koncu expozičnej periódy a v žiadnom prípade nie skôr ako v jedenástom týždni sa skontroluje senzorická reaktivita na stimuláciu rôznych typov (1), napr. zvuková, vizuálna a proprioceptívna stimulácia (2), (3), (4), odhadnutie intenzity zovretia (5) a odhad motorickej aktivity (6). Ďalšie podrobnosti o postupoch, ktoré môžu nasledovať, sú dané v uvedenej použitej literatúre. Je možné použiť aj iné alternatívne postupy k tomu, čo tu bolo doposiaľ napísané.

Pozorovanie funkčných porúch vykonávané ku koncu štúdie možno vynechať, ak sú údaje o pozorovaní funkčných porúch dostupné z iných štúdií a ak denné klinické pozorovanie neprekáža žiadnej funkčnej poruche.

▼B

Výnimočne je možné vynechať funkčné pozorovania pre skupiny s inými znakmi stupňa toxicity, značne interferujú s funkčným testom na účinnosť.

1.5.2.1. *Telesná hmotnosť a spotreba potravy/vody*

Všetky zvieratá sa musia vážiť najmenej raz za týždeň. Meranie spotreby potravy sa robí najmenej raz za týždeň. Ak sa testovaná látka podáva vo vode na pitie, spotreba vody sa musí merať raz za týždeň. Spotreba má tiež význam pre dietetické štúdie alebo štúdie s použitím trubice, počas ktorých sa môže meniť.

1.5.2.2. *Hematológia a klinická biochémia*

Krvné vzorky sa odoberajú z označených miest a uložia sa za vhodných podmienok. Na konci testovacej periódy sa vzorky zozbierajú práve pred utratením alebo ako časť procedúry utratenia zvierat.

Nasledujúce hematologické vyšetrenia sa vykonávajú na konci testovacej doby, ak sú všetky predbežné vzorky zozbierané: hematorit, koncentrácia hemoglobínu, počet erytrocytov, celkový diferenciálny počet leukocytov, počet krvných doštičiek, meranie zrážanlivosti krvi/potenciál.

Klinické biochemické stanovenia vyšetrujúce hlavné toxické účinky v tkanive a špecifický vplyv na obličky a pečeň sa vykonávajú na krvných vzorkách získaných od každého zvieraťa práve pred utratením alebo ako súčasť procedúry utratenia zvierat (okrem zistených ako umierajúcich a/alebo zabitých). V podobných metódach hematologických vyšetrení sa môže vykonať predložené vzorkovanie na klinické biochemické testy. Odporúča sa, aby sa zvieratá pred odobratím vzoriek krvi cez noc postili ([1]). Zisťovanie v plazme alebo sére zahŕňa sodík, draslík, glukózu, celkový cholesterol, močovinu, dusík z močoviny v krvi, kreatín, celkové bielkoviny a albumín a viac ako dva indikujúce hepatocelulárne (účinky na pečeňové bunky) účinky ako napr. alanín, amini-transferázy, aspartát aminotransferázy, alkalická fosfatáza, gama glutamyl transpeptidáza a sorbitol dehydrogenáza. Za istých okolností sem môžeme zahrnúť aj merania ďalších enzýmov (hepatické alebo iného pôvodu) a žlčových kyselín, ktoré môžu poskytnúť užitočné informácie.

Podľa potreby sa nasledujúce zistenia v analýzach moču môžu vykonať počas posledného týždňa štúdie a použije sa časový zber objemu moču: vzhľad, objem, osmolalita alebo špecifická váha, pH, bielkoviny, glukóza a krv/krvné bunky.

Okrem toho by sa mali brať do úvahy aj štúdie na vyšetrovanie sérových markerov v základných poškodených tkanivách. Ostatné zisťovanie je možné uskutočniť, ak poznáme vlastnosti, ktoré môžu alebo sa o nich predpokladá, že vplývajú na príbuzné metabolické profily zahrňujúce vápnik, fosfor urýchľovacie triglyceridy, špecifické hormóny, methemoglobín a cholinesterázu. Preto je ich nutné identifikovať ako chemické látky v určitých triedach alebo ako individuálne v závislosti od prípadu.

([1]) Pri množstve meraní v sére a plazme, najvýznamnejšie na meranie glukózy, sa preferuje nechať zvierat cez noc bez potravy. Hlavný dôvod tohto uprednostňovania je, že zvýšená variabilita, ktorá je nutným následkom pri podávaní stravy/nepostení sa/, môže mať tendenciu zakryť nepatrné účinky, a tým sťažiť následné vyhodnotenie. Na druhej strane, hoci celonočný pôst môže interferovať s obecným metabolizmom zvierat a predovšetkým v štúdiách o kŕmení, denné pôsobenie testovanej látky sa týmto môže narušiť. Ak sa pristúpi na celonočný pôst, klinické biochemické stanovenia sa vykonajú po kontrole funkčných pozorovaní štúdie.

▼B

Celkove je potrebný flexibilný prístup, ktorý závisí od druhov a pozorovaných a/alebo očakávaných účinkov danej látky.

Ak sú historické základné údaje neprimerane, je treba zvážiť, či premenné hematologické a premenné klinickej biochémie je potrebné stanoviť pred začatím dávkovania, nie je všeobecne odporučené, aby tieto údaje boli zisťované pred liečbou.

1.5.2.3. *Všeobecná pitva*

Všetky zvieratá v štúdií budú predmetom úplnej detailnej pitvy, ktorá zahŕňa podrobné vyšetrenie externého povrchu tela a všetkých telesných otvorov a lebečnej, hrudnej a brušnej dutiny. Pečeň, obličky, nadobličky, semenníky, nadsemenníky, maternica, vaječníky, týmus, slezina, mozog a srdce zo všetkých zvierat (okrem tých, ktoré chradnú a/alebo zvierat, ktoré boli predtým utratené) by sa mali pitvať na nejakej priľnavej tkanine a je potrebné čo najrýchlejšie zistiť ich mokrú hmotnosť skôr, ako pri pitve vyschnú.

Nasledujúce tkanivá by mali uchovávať v čo najvhodnejšom fixačnom médiu na obidva typy tkanív a na následné histopatologické skúšky: všetky závažné poškodenia, mozog/reprezentatívne oblasti, zahrňujúce veľký mozog, mozoček, Varolov most/, miecha (v troch úrovniach: krčná, hrudná, bedrová), hypofýza, štítna žľaza, prištítna žľaza, týmus, pažerák, slinné žľazy, žalúdok, tenké a hrubé črevo, Peyerove žľazy, pečeň, obličky, pankreas, nadobličky, slezina, srdce, priedušnica a pľúcne laloky (ochránené nafúknutím, fixáciou a potom ponorením), aorta, gonády, maternica, prídavné pohlavné orgány, samičie mliečne žľazy, prostata, močový mechúr, žlčník, lymfatické uzliny (uprednostňujúc jednu lymfatickú uzlinu pokrývajúcu cestu šírenia a druhú, vzdialenú od tejto cesty šírenia na pokrytie systémového vplyvu), periférne nervy (sedacie alebo holenné) najlepšie v tesnej blízkosti svalov, časť kostnej drene (a/alebo získať čerstvú kostnú dreň), koža a oči (ak boli zistené zmeny počas oftalmologických vyšetrení). Z klinických a iných nálezov môže vyplynúť potreba vyšetrenia ďalších dodatočných tkanív. Takisto by mali ostať zachované orgány považované za cieľové orgány, založené na známych vlastnostiach testovanej látky.

1.5.2.4. *Histopatológia*

Úplná histopatológia sa uskutoční na uskladnených orgánoch a tkanivách všetkých zvierat v kontrolnej skupine a v skupinách s vysokými dávkami. Tieto skúšky sa rozšíria o zvieratá zo všetkých skupín s odlišným dávkovaním, ak boli zistené zmeny v skupine s vysokými dávkami.

Preskúmajú sa všetky závažné poškodenia.

Ak boli použité satelitné skupiny, histopatológia sa vykoná na tkanivách a orgánoch identifikovaných ako vykazujúce účinky v spracovaných skupinách.

1.5.2.5. *Preskúmajú sa všetky závažné poškodenia.*

Ak boli použité satelitné skupiny, histopatológia sa vykoná na tkanivách a orgánoch identifikovaných ako vykazujúce účinky v spracovaných skupinách.

▼B

2. **ÚDAJE A HLÁSENIE**

2.1. ÚDAJE

Po získaní jednotlivých údajov sa všetky tieto následne zosumarizujú v tabuľkovej forme, vykazujúcej na každú testovanú skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet nájdených mŕtvych zvierat počas testu alebo usmrtených z humanitných dôvodov a čas smrti alebo čas usmrtenia z humanitných dôvodov, počet vykázaných znakov toxicity, opis zistených znakov toxicity, zahrňujúcich čas vzniku, trvanie sily toxických účinkov, počet zvierat vykazujúcich lézie (poškodenia), typ lézií a percento zvierat vykazujúcich každý typ lézie.

Ak je to možné, numerické výsledky sa vyhodnotia vhodnou a všeobecne uplatniteľnou metódou. Štatistické metódy a údaje, ktoré sa podrobia analýze, sa vyberú počas prípravy koncepcie štúdie.

2.2. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať nasledujúce informácie:

2.2.1. **Testovaná látka:**

— fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje,

— nosič (ak je to vhodné): opodstatnenosť výberu nosiča, ak je iný ako voda.

2.2.2. **Testovaný druh:**

— druhy a rody používaných zvierat,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky uskladňovania, potrava atď.,

— individuálne hmotnosti zvierat na začiatku testu.

2.2.3. **Podmienky testu:**

— odôvodnenie na výber úrovne hladiny dávky,

— podrobnosti formulácie testovanej látky/príprav a potravy, dosiahnutá koncentrácia, stabilita a homogenita prípravy,

— podrobnosti o podávaní testovanej látky,

— aktuálne dávky (mg/kg telesnej hmotnosti/deň) a faktov konverzie z potravy/pitnej vody, testovanej látky, koncentrácia na aktuálnu dávku,

— detaily o kvalite potravy a vody.

2.2.4. **Výsledky:**

— telesná hmotnosť a zmeny telesnej hmotnosti,

— spotreba potravy a spotreba vody, ak je to možné,

— údaje o toxikologickej reakcii podľa pohlavia a úrovne dávky, zahrňujúce známky toxicity,

▼B

— charakter, prudkosť a trvanie klinických pozorovaní (či sú reverzibilné alebo nie),

— výsledky oftalmologických vyšetrení,

— odhad senzorickej aktivity, intenzity stlačenia, zovretia a motorickej aktivity (ak sú informácie k dispozícii),

— hematologické testy s významnými základnými hodnotami,

— klinické biochemické vyšetrenia s príslušnými výstupnými normálnymi hodnotami,

— konečná telesná hmotnosť, hmotnosť orgánov a pomer hmotnosti orgánov k telesnej hmotnosti,

— pitevné nálezy,

— detailné opisy všetkých histopatologických nálezov,

— absorpčné údaje, ak sú dostupné,

— štatisticky spracované výsledky, ak je to vhodné.

Diskusia o výsledkoch

Závery

3. **POUŽITÁ LITERATÚRA**

(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, 999 – 1003.

(3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J.Toxicol. Environ. Health, 9, 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, 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 Hindlimb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, 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, 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, 198 – 201.

▼B

B.27. **TEST SUBCHRONICKEJ ORÁLNEJ TOXICITY: OPAKOVANÁ 90-DŇOVÁ ŠTÚDIA ORÁLNEJ TOXICITY U NEHLODAVCOV**

1. **METÓDA**

Táto testovacia metóda subchronickej orálnej toxicity je kópiou OECD TG 409 (1998).

1.1. ÚVOD

Stanovenie a vyhodnotenie toxických charakteristík toxicity chemikálie, stanovenie subchronickej orálnej toxicity metódou opakovaných dávok, môže byť vykonané až po získaní východiskových informácií o toxicite z krátkodobých alebo 28-dňových testov metódou opakovaných dávok. 90-dňová štúdia poskytuje informácie o možných rizikách ohrozenia zdravia, ktoré môžu vzniknúť pri opakovanom vystavení sa počas obdobia rýchleho rastu a do mladej dospelosti: Štúdia poskytuje informácie o hlavných toxických účinkoch, určuje cieľové orgány a možnosti akumulácie. Ďalej umožňuje odhad úrovne nezistených nepriaznivých účinkov pôsobenia látky, ktoré je možné použiť pri výbere úrovne dávok na dlhodobé štúdie a na ustanovenie bezpečnostných kritérií s ohľadom na ich vplyv na človeka.

Testovacia metóda umožňuje identifikáciu nepriaznivých účinkov pôsobenia na druhy nehlodavcov a používa sa iba:

— ak účinky zistené inými štúdiami indikujú potrebu vyjasnenia/charakterizácie v druhom druhu nehlodavcov alebo

— ak toxiko-kinetická štúdia indikuje, že použitie špecifických nehlodavých druhov je najdôležitejším výberom laboratórnych zvierat, alebo

— ak iné špecifické dôvody zdôvodňujú použite nehlodavých druhov.

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Dávka: množstvo podávanej testovanej látky. Dávka je vyjadrená ako hmotnosť (g, mg) alebo ako hmotnosť testovanej látky per jednotkovú hmotnosť testovaného zvieraťa (napr. mg/kg) alebo konštantné dietetické koncentrácie (ppm).

Dávkovanie: všeobecný pojem, ktorý zahŕňa dávku, jej frekvenciu a trvanie.

NOAEL: skratka pre stupeň nezistených škodlivých účinkov a je najvyššou možnou dávkou, pri ktorej sa neobjavili žiadne škodlivé nálezy v súvislosti s liečbou.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka je podávaná denne, orálne, v odstupňovaných dávkach niekoľkým skupinám testovaných zvierat, jedna úroveň dávky na skupinu počas 90-tich dní. Počas tohto obdobia sú na zvieratách dôkladne pozorované prípadné znaky toxicity látok. Zvieratá, ktoré uhynú alebo sú usmrtené počas testu, sú pitvané a na záver testu sú usmrtené a pitvané aj zvieratá, ktoré prežili.

▼B

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Výber druhov zvierat**

Obvykle používaný druh nehlodavcov je pes, ktorý by mal mať definované plemeno, často je používaný druh malého stavača. Môžeme tiež použiť aj iné druhy ako napr. ošípané, mini-prasiatka. Primáty sa neodporúčajú a ich použitie musí byť odôvodnené. Používajú sa mladé zdravé zvieratá a v prípade psov dávkovanie začína v 4 – 6. mesiaci a nie neskôr ako v 9. mesiaci veku psa. Ak je štúdia usmerňovaná ako predbežná dlhodobá štúdia chronickej toxicity, musia sa použiť v obidvoch štúdiách rovnaké plemená/druhy.

1.4.2. **Príprava zvierat**

Môžu sa použiť mladé zdravé zvieratá, ktoré sa aklimatizovali v laboratórnych podmienkach a neboli predmetom predchádzajúcich experimentálnych postupov. Dĺžka aklimatizácie závisí od vybraných testovaných druhov a ich zdrojov. Odporúča sa najmä 5 dní pre psov alebo účelovo chované ošípané s rezidentských kolónií a najmenej dva týždne pre tie zvieratá, ktoré sú z vonkajších zdrojov. Testované zvieratá majú byť charakterizované podľa druhu, rodu, zdroja, pohlavia, hmotnosti a/alebo veku. Zvieratá by mali byť postupne zadelené do kontrolných a liečebných skupín. Klietky by mali byť umiestnené takým spôsobom, aby sa minimalizoval vplyv vzhľadom na ich rozmiestnenie. Každé zviera by malo byť označené svojim identifikačným číslom.

1.4.3. **Príprava dávok**

Testovaná dávka sa podáva v potrave alebo v pitnej vode cez trubicu priamo do žalúdka alebo v kapsulách. Metóda orálneho podávania závisí od účelu štúdie a fyzikálno-chemických vlastností testovaného materiálu.

V prípade potreby sa testovaná látka rozpustí alebo vytvorí suspenziu vo vhodnom nosiči. Odporúča sa, aby sa vždy, ak je to možné, uvažovalo o použití vodných roztokov/suspenzií ako prvých v poradí, nasledovaných vážením roztoku/emulzie v oleji (napr. kukuričný olej) a až potom o možných roztokoch v iných nosičoch. Charakteristiky toxicity nosičov iných ako voda musia byť známe. Stanoví sa stabilita testovanej látky za podmienok podávania.

1.5. POSTUP

1.5.1. **Počet a pohlavie zvierat**

Pre každú úroveň dávky sa použije aspoň 8 zvierat (štyri samice a štyri samce). Ak sa plánujú predbežné usmrtenia, počet zvierat by mal byť zvýšený o plánovaný počet zvierat, ktoré majú byť usmrtené pred kompletizáciou štúdie. Počet zvierat, ktoré ukončia štúdiu, musí byť primeraný na zmysluplné vyhodnotenie toxických účinkov. Na základe predošlých znalostí o látke alebo jej blízkych analógoch dôraz sa kladie na zahrnutie doplnkových satelitných skupín s ôsmimi zvieratami (štyri na každé pohlavie) v kontrolnej skupine a v skupine s najvyšším dávkovaním na pozorovanie reverzibility po období, ak boli podrobené vplyvu nejakých toxických účinkov. Trvanie tohto obdobia po vystavení účinkom sa stanoví s ohľadom na zistené vplyvy.

▼B

1.5.2. **Dávkovanie**

Tento test je vhodné vykonať najmenej v troch hladinách dávky a súbežne kontrolovať, s výnimkou testov, v ktorých sa prevádza limitný test (pozri 1.5.3). Úroveň dávky sa môže zakladať na výsledkoch štúdií opakovaného dávkovania alebo štúdií rozsahu nálezov a malo by sa prihliadať na existujúce toxikologické a toxikokinetické údaje dostupné na testovanú zlúčeninu alebo príbuzné materiály. Ak to nie je limitované fyzikálno-chemickou podstatou alebo biologickými účinkami testovanej látky, najvyššia dávka by sa mala vybrať s cieľom vyvolať toxicitu, ale nie úhyn alebo kruté utrpenie. Potom prejdeme na klesajúcu postupnosť úrovne hladín dávkovania so zámerom preukázať, že každá dávka má za následok reakciu, odozvu a že nebol pozorovaný škodlivý účinok pri najnižšej hladine dávkovania (NOAEL). Dvoj- až štvornásobné intervaly sú často optimálne pri stanovení zostupných hladín dávkovania a pre dodatočnú štvrtú testovanú skupinu sa často dodržiavajú veľmi veľké odstupy (napr. viac ako faktor 6-10) medzi dávkami.

Kontrolná skupina je skupina, ktorá nebola podrobená účinkom testovaných materiálov, alebo skupina kontroly nosiča, ak bol nosič používaný pri podávaní testovanej látky. Bez ohľadu na aplikovanie testovanej látky, so zvieratami v kontrolnej skupine zaobchádzame rovnakým spôsobom ako s tými, ktoré sú v testovanej skupine. Ak sa použije nosič, kontrolná skupina ho dostane v čo najväčšom množstve. Ak sa testovaná látka podáva v potrave a spôsobuje redukciu príjmu potravy, potom je vhodné použiť dve súčasne kŕmené skupiny na rozlíšenie zníženia príjmu potravy kvôli nechutenstvu alebo toxikologickým zmenám v testovacom modeli.

Je potrebné venovať náležitú pozornosť nasledujúcim vlastnostiam nosiča a iných aditív: vplyv na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo zadržiavanie testovanej látky, vplyvy na chemické vlastnosti testovanej látky, ktoré môžu zmeniť svoje toxické vlastnosti, vplyv na spotrebu potravy a vody alebo na stav výživy zvierat.

1.5.3. **Limitný test**

Ak test pri jednej hladine dávkovania ekvivalentnej najmenej 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň, ktorý využíva postupy opísané v tejto štúdií, neposkytne údaje o zistených škodlivých účinkoch a ak ich toxicita nebola na očakávanej úrovni na základe z údajov pre látky s príbuznou štruktúrou, potom nie je potrebné uvažovať o úplnej štúdii, ktorá využíva tri hladiny dávkovania. Limitný test sa uplatňuje, ak pôsobenie na človeka poukazuje potrebu použitia vyššej hladiny dávkovania.

1.5.4. **Podávanie dávok**

Zvieratám sa aplikuje dávka s testovacou látkou denne počas siedmich dní v týždni v období 90-tich dní. Použitie každého iného režimu dávkovania, napr. 5 dní v týždni, musí byť opodstatnené. Ak je testovaná látka podávaná cez trubicu, musí sa to realizovať v jednej dávke pre zviera za použitia žalúdočnej trubice alebo vhodnej intubačnej kanyly. Maximálny objem kvapaliny, ktorý môže byť naraz podaný, závisí od veľkosti testovaného zvieraťa. Obvykle je objem čo najmenší. S výnimkou dráždivých alebo korozívnych látok, ktoré bežne preukazujú zhoršujúci sa účinok vo vysokých koncentráciách, variabilita testovaných objemov sa minimalizuje nastavením koncentrácií tak, aby sa zaistil konštantný objem pre všetky hladiny dávkovania.

▼B

Pre látky, ktoré sú podávané ako súčasť potravy alebo pitnej vody, je dôležité zaistiť, aby množstvo obsiahnutej testovanej látky neinterferovalo s normálnou nutričnou hodnotou alebo vodnou rovnováhou. Ak je testovaná látka podávaná v potrave, je možné použiť buď konštantnú dietetickú koncentráciu (ppm), alebo konštantnú hladinu dávkovania s ohľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa. Látky podávané cez trubicu alebo v kapsuliach podávame každý deň v rovnakom čase a nastavíme ich dávkovanie tak, aby sa dodržalo konštantné dávkovanie vzhľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa. Ak sa 90-dňová štúdia použije ako predbežná štúdia na dlhodobú štúdiu chronickej toxicity, podávame podobnú potravu v obidvoch štúdiách.

1.5.5. **Pozorovania**

Doba pozorovania má byť najmenej 90 dní. Zvieratá v satelitných skupinách, naplánované na nasledujúce pozorovania, budú určitú dobu bez vystavenia účinkom testov s cieľom detegovať stálosť alebo zotavenie sa z toxických účinkov.

Všeobecné klinické pozorovania sa budú vykonávať najmenej raz denne, najlepšie každý deň v rovnakom čase, s ohľadom na vrchol doby očakávaných účinkov po dávkovaní. Klinické podmienky zvierat musia byť zaznamenané najmenej dvakrát denne, obvykle na začiatku a konci dňa sú zvieratá podrobené kontrole patologických zmien a úmrtnosti.

Detailné klinické pozorovania na všetkých zvieratách sa vykonajú najmenej jedenkrát pred prvou expozíciou (aby sa umožnilo v rámci subjektov porovnanie), raz za týždeň po expozícií. Tieto pozorovania sa vykonávajú v domovskej klietke v štandardnej aréne a najlepšie v rovnakom čase pri každej príležitosti. Je potrebné minimalizovať odlišnosti v podmienkach pozorovaním. Známky toxicity musia byť podrobne zaznamenané, musia zahŕňať čas nasadenia, stupeň a trvanie. Ak nie sú pozorovania limitované, musia obsahovať zmeny na pokožke, kožušine, očiach, slizniciach, výskyt sekrétov a vylučovanie a automatické činnosti (napr. lakrimácia, pilo-erekcia, veľkosť zreníc, neobvyklé dýchanie). Zaznamenané budú: zmeny v chôdzi, držaní tela, v reakcii na manipuláciu, ako aj prítomnosť klonických alebo napätých pohybov, stereotypy (napr. točenie, nadmerné čistenie) alebo iné zvláštne správanie.

Oftalmologické vyšetrenia, pri ktorých sa používajú oftalmoskopy a iné ekvivalentné vhodné zariadenia, sa vykonávajú pred podávaním testovanej látky a po ukončení štúdie, najlepšie na všetkých zvieratách, ale najmenej v skupine s vysokými dávkami a v kontrolnej skupine. Ak sa po vystavení zvierat účinkom látky zistia zmeny na očiach, musia byť vyšetrené všetky zvieratá.

1.5.5.1. *Telesná hmotnosť, spotreba vody a potravy*

Všetky zvieratá sa musia vážiť najmenej raz za týždeň. Meranie spotreby potravy sa robí týždenne. Ak sa testovaná látka podáva vo vode na pitie, spotrebu vody je tiež potrebné merať raz za týždeň. Spotreba vody môže byť tiež významná na dietetické štúdie alebo štúdie s použitím trubice, počas ktorých je možné túto meniť.

▼B

1.5.5.2. *Hematológia a klinická biochémia*

Krvné vzorky sa odoberajú z označených miest a uložia sa za vhodných podmienok. Na konci testovacej periódy sa vzorky zozbierajú práve pred alebo ako súčasť procedúry utratenia zvierat.

Hematológia vrátane hematokrit, koncentrácia hemoglobínu, počet erytrocytov, celkový a diferenciálny počet leukocytov, počet krvných doštičiek a meranie potenciálu zrážanlivosti, ako napríklad doba zrážanlivosti, doba protrombínu alebo tromboplastov, sa vyšetruje na začiatku štúdie, potom v mesačných intervaloch alebo v polovici testovacej periódy a na konci testovacej periódy.

Klinické biochemické vyšetrenia, ktoré skúmajú hlavne toxické vplyvy na tkanivá a špecifický účinok na pečeň alebo obličky, sa vykonajú na krvných vzorkách, získaných od zvierat na začiatku, potom v mesačných intervaloch alebo v polovici testovacej periódy a na konci testovacej periódy. Pozornosť sa upriami najmä na tieto testované parametre: rovnováha elektrolytov, metabolizmus karbohydrátov, funkcia pečene a obličiek. Výber špecifických testov ovplyvňuje pozorovania druhov reakcií na testovanú látku. Zvieratá by sa mali postiť pred odberom krvných vzoriek, počas obdobia vhodného na daný druh. Navrhované vyšetrenia zahŕňajú stanovenie vápnika, fosforu, chloridov, sodíka, draslíka, glukózy, alanínaminotransferázy, aspartátu aminotransferázy, ornithínu, dekarboxylázy, gama-glutamyl, transpeptidázy, močovinového dusíka, albumínu, krvného kreatínu, celkového bilirubínu a celkový protein v sére.

Vyšetrenia moču sa vykonávajú najmenej na začiatku, potom v strede a na konci štúdie, pri ktorej sa využíva časový zber objemu moču. Vyšetrenia zahŕňajú vzhľad, objem, osmolalitu alebo špecifickú hmotnosť, pH, bielkovinu, glukózu a krv alebo krvné bunky. Dodatočné parametre môžu byť vyšetrované, ak je potrebné rozšíriť vyšetrovanie získaných účinkov.

Okrem toho sa zvažuje vykonanie štúdie vyšetrujúcej markery základných poškodených tkanív. Iné stanovenia, ktoré môžu byť potrebné na primerané toxikologické vyhodnotenie, zahŕňajú analýzu lipidov, hormónov, acido/bazickú rovnováhu, methemoglobín a inhibíciu cholinesterázy. Dodatočne sa môže uskutočniť aj ďalšia klinická biochémia, ak je potrebné rozšíriť vyšetrenie zistených účinkov. Je ich potrebné identifikovať pre chemické látky v určitých skupinách alebo posúdiť prípad po prípade.

Celkovo sa požaduje flexibilný prístup, ktorý závisí od druhu zvierat a pozorovaných a/alebo očakávaných účinkov danej látky.

1.5.5.3. *Všeobecná, celková pitva*

Všetky zvieratá v štúdii budú predmetom úplnej detailnej všeobecnej pitvy, ktorá zahŕňa pozorné vyšetrenie vonkajšieho povrchu tela, všetkých telesných otvorov a lebečnej, hrudnej, brušnej dutiny a ich obsahu. Pečeň, žlčník, obličky, nadobličky, semenníky, nadsemenníky, vaječníky, maternica, štítna žľaza spolu s prištítnou žľazou, týmus, slezina, mozog a srdce zo všetkých zvierat (okrem tých, u ktorých sa zistilo chradnutie alebo predchádzajúce utratenie) by mali byť upravené na nejakej priľnavej tkanine a ich mokrá hmotnosť sa zistí čo najskôr, kým orgány pri pitve nevyschnú.

▼B

Tieto tkanivá by sa mali uchovávať v čo najvhodnejšom fixačnom médiu na obidva typy tkanív a na neskoršie histopatologické skúšky: všetky závažné poškodenia, mozog (reprezentatívne oblasti zahrňujúce veľký mozog, mozoček, Varolov most, miecha (v troch úrovniach: krčná, hrudná, bedrová), hypofýza, štítna žľaza, prištítna žľaza, týmus, pažerák, slinné žľazy, žalúdok, tenké a hrubé črevo, Peyerove žľazy, pečeň, pankreas, obličky, nadobličky, slezina, srdce, priedušnica a pľúcne laloky (ochránené nafúknutím, fixáciou a potom ponorením), aorta, gonády, maternica, prídavné pohlavné orgány, samičie mliečne žľazy, prostata, močový mechúr, žlčník, lymfatické uzliny (uprednostňujúc jednu lymfatickú uzlinu pokrývajúcu cestu šírenia a druhú, vzdialenú od tejto cesty, šírenia pokrytia systematických účinkov), periférne nervy (sedacie alebo holenné), najlepšie v tesnej blízkosti svalov, časť kostnej drene (a/alebo získať čerstvú kostnú dreň), koža a oči (ak boli zistené zmeny počas oftalmologických vyšetrení). Z klinických a iných nálezov môže vyplynúť potreba vyšetrenia ďalších následných tkanív. Takisto by sa mali zachovať orgány považované za cieľové orgány, založené na známych vlastnostiach testovanej látky.

1.5.5.4. *Histopatológia*

Úplná histopatológia sa uskutoční na uskladnených orgánoch a tkanivách všetkých zvierat v kontrolnej skupine a v skupinách s vysokými dávkami. Tieto skúšky sa rozšíria o zvieratá zo všetkých skupín s odlišným dávkovaním, ak boli zistené zmeny v skupine s vysokými dávkami.

Všetky závažné poškodenia budú preskúmané.

Ak boli použité satelitné skupiny, histopatológia sa vykoná na tkanivách a orgánoch identifikovaných ako vykazujúce účinky v spracovaných skupinách.

2. ÚDAJE A SPRÁVA

2.1. ÚDAJE

Po získaní jednotlivých údajov sa tieto zosumarizujú v tabuľkovej forme, vykazujúcej pre každú testovanú skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet nájdených mŕtvych zvierat počas testu alebo usmrtených z humanitných dôvodov a čas smrti alebo čas usmrtenia z humanitných dôvodov, počet vykázaných znakov toxicity, opis zistených znakov toxicity, zahrňujúcich čas vzniku, trvanie sily toxických účinkov, počet zvierat vykazujúcich lézie (poškodenia), typ lézií a percento zvierat vykazujúcich každý typ lézie.

Ak je to možné, numerické výsledky budú spracované vhodne a všeobecne uplatniteľnou metódou. Štatistické metódy a údaje, ktoré budú analyzované, budú vybraté počas tvorby dizajnu štúdie.

2.2. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať nasledujúce informácie:

▼B

2.2.1. **Testovaná látka:**

— fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje,

— nosič (ak je to vhodné): opodstatnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda.

2.2.2. **Testovaný druh:**

— druhy a rody používaných zvierat,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky uskladnenia, potrava atď.,

— individuálne hmotnosti zvierat na začiatku testu.

2.2.3. **Podmienky skúšky (testu):**

— odôvodnenie na výber hladiny dávky,

— detaily o testovanej látke, formulácia/príprava potravy, dosiahnuté koncentrácie, stabilita a homogenita prípravy,

— detaily o podávaní testovanej látky,

— aktuálne dávky (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), faktor konverzie z potravy/pitnej vody, koncentrácia testovanej látky v (ppm), ak je to možné,

— detaily o kvalite potravy a vody.

2.2.4. **Výsledky:**

— telesná hmotnosť a zmeny telesnej hmotnosti,

— spotreba potravy a spotreba vody, ak je to možné,

— údaje o toxikologickej reakcii podľa pohlavia a úrovne dávky, zahrňujúce známky toxicity,

— charakter, tvrdosť a trvanie klinických pozorovaní (či sú reverzibilné alebo nie),

— výsledky oftalmologických vyšetrení,

— hematologické testy s významnými základnými hodnotami,

— odkazy senzorickej aktivity, intenzity stlačenia, zovretia a motorickej aktivity (ak sú dostupné),

— konečná telesná hmotnosť, hmotnosť orgánov a pomer hmotnosti orgánov k telesnej hmotnosti,

— pitevné nálezy,

— detailné opisy všetkých histopatologických nálezov,

— absorpčné údaje, ak sú dostupné,

— štatisticky spracované výsledky, ak je to vhodné.

Diskusia o výsledkoch

Závery

▼B

B.28. **ŠTÚDIA SUBCHRONICKEJ DERMÁLNEJ TOXICITY PO 90-DŇOVEJ OPAKOVANEJ KOŽNEJ APLIKÁCII U HLODAVCOV**

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PODSTATA SKÚŠOBNEJ METÓDY

Testovaná látka sa denne nanáša na kožu, v odstupňovaných dávkach niekoľkým skupinám pokusných zvierat, každej skupine jedna úroveň dávky 90 dní. V priebehu obdobia podávania sa zvieratá každý deň pozorujú, aby sa zistili príznaky toxicity. Zvieratá, ktoré počas skúšky uhynuli, a aj zvieratá, ktoré do konca skúšky prežili, sa pitvú.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Neustanovené.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Príprava

Najmenej päť dní pred testom si zvieratá zvykajú na chovateľské a vyživovacie podmienky, v ktorých budú počas experimentu. Pred testom sa zdravé mladé zvieratá randomizujú a priradia sa k pokusným a kontrolným skupinám. Krátko pred začatím testu sa zvieratám ostrihá srsť na chrbte. Vyholenie srsti je tiež prípustné, malo by sa však uskutočniť asi 24 hodín pred testom. Ostrihanie alebo oholenie je zvyčajne potrebné opakovať približne v týždenných intervaloch. Pri strihaní alebo holení srsti je potrebné dať pozor na to, aby sa neporanila koža. Pre aplikáciu testovanej látky sa pripraví najmenej 10 % povrchu tela. Pri rozhodovaní o veľkosti pripravovanej plochy kože, ktorá má byť zbavená srsti a o veľkosti krycieho obväzu treba vziať do úvahy hmotnosť zvierat. Pri testoch pevných látok, ktoré môžu byť v prípade potreby rozdrvené na prach, sa testovaná látka dostatočne navlhčí vodou, poprípade vhodnou pomocnou látkou, aby bol zaistený dostatočný styk s kožou. Kvapalné testované látky sa spravidla aplikujú neriedené. Aplikácia sa uskutočňuje päť až sedem dní v týždni.

Podmienky testovania

Pokusné zvieratá

Je možné použiť potkana, králika alebo morča. Je možné použiť aj iné živočíšne druhy, ale ich použitie musí byť zdôvodnené. Na začiatku testu by nemali byť odchýlky hmotnosti použitých zvierat viac ako ± 20 % od prispôsobenej strednej priemernej hodnoty. Ak sa uprednostňuje subchronická dermálna štúdia ako predbežná štúdia pred dlhodobou štúdiou, mal by byť v oboch štúdiách použitý rovnaký druh zvierat a rovnaký kmeň.

▼B

Počet a pohlavie

Pre každú pokusnú skupinu by sa malo použiť minimálne 20 zvierat (10 samičiek a 10 samčekov) so zdravou kožou. Samičky nesmú byť ani po vrhu a ani nesmú byť gravidné. Ak majú byť počas testu usmrtené zvieratá, zvýši sa celkový počet zvierat o počet zvierat, ktoré majú byť usmrtené ešte pred koncom testu. Okrem toho sa môže vystaviť aj dodatočná skupina (satelitná skupina) s 20 zvieratami (10 samičiek a 10 samčekov) počas 90 dní najvyššej dávke, aby sa počas 28 dní po vystavení mohla sledovať reverzibilita, pretrvávanie alebo oneskorený prejav toxických účinkov.

Expozičné koncentrácie

Potrebné sú minimálne tri koncentrácie a jedna kontrolná skupina. Odhliadnuc od aplikácie testovanej látky sa zvieratá v kontrolnej skupine musia vystaviť rovnako ako pokusné zvieratá. Ak sa pre uľahčenie dávkovania používa pomocná látka, podáva sa kontrolnej skupine rovnakým spôsobom ako pokusným zvieratám, a to v rovnakom množstve, aké prijme skupina, ktorej sa aplikuje najvyššia dávka. Doba vystavenia by mala byť najmenej šesť hodín denne. Testovaná látka by sa mala aplikovať každý deň približne v rovnakom čase a dávkovanie by malo byť pravidelne (týždenne alebo každých štrnásť dní) prispôsobené, aby bolo konštantné vzhľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa. Najvyššia koncentrácia sa volí tak, aby v každom prípade došlo k toxickému účinku, ale aby zvieratá nehynuli alebo iba v malom množstve. Najnižšia koncentrácia by nemala spôsobovať žiadne príznaky toxicity. Ak existujú použiteľné odhady o úrovni vystavenia u človeka, najnižšia dávka by mala túto hodnotu prekročiť. V ideálnom prípade by mala stredná dávka spôsobiť len nízke toxické účinky. Ak sa podávajú viaceré medzikoncentrácie, musia sa voliť tak, aby došlo k postupnej klasifikácii toxických účinkov. V skupinách s nízkou a strednou koncentráciou, ako aj v kontrolných skupinách, by mal byť počet úmrtí nízky, aby sa umožnilo výrazne vyhodnotenie výsledkov.

Ak aplikácia testovanej látky smeruje k závažnému podráždeniu kože, je potrebné znížiť dávku, čo u vysokej koncentrácie môže viesť k obmedzeniu alebo eliminácii iných toxických účinkov. Ak už došlo k závažnému poškodeniu kože, je potrebné test ukončiť a uskutočniť ho znova s nižšími koncentráciami.

Limitný test

Ak predbežná štúdia pri koncentrácii 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti za deň alebo pri vyššej koncentrácii zodpovedajúcej prispôsobenej vystaveniu u človeka, ak je táto známa, nevyvolá žiadne toxické účinky, nie je ďalšie testovanie nutné.

Doba pozorovania

Zvieratá sa pozorujú denne a zaznamenávajú sa prejavy toxicity, včítane času úmrtia a času, v ktorom sa objavili a znova odzneli toxické účinky.

▼B

Postup

Zvieratá sa chovajú jednotlivo v klietkach. Testovaná látka sa v ideálnom prípade zvieratám podáva sedem dní v týždni po dobu 90 dní.

Zvieratá satelitnej skupiny, ktoré sú určené na dodatočné pozorovanie, by nemali byť ďalších 28 dní vystavené, aby sa dala zistiť reverzibilita toxických účinkov alebo pretrvávanie toxických účinkov. Doba vystavenia by mala byť najmenej šesť hodín denne.

Testovaná látka sa nanesie rovnomerne na plochu, ktorá sa rovná asi 10 % celkového povrchu tela. V prípade vysokotoxických látok môže byť táto plocha menšia, no mala by sa však pokryť čo najväčší časť tejto plochy čo najslabšou a naj rovnomernejšou vrstvou.

Počas vystavenia sa testovaná látka udržuje v styku s kožou pomocou porézneho mulového obväzu a nedráždivej náplasti. Testovaná plocha sa ďalej vhodným spôsobom prekryje, aby sa mulový obväz a testovaná látka fixovali a aby zvieratá testovanú látku nepožili. K zamedzeniu požitia látky je možné použiť aj prostriedky pre obmedzenie voľnosti pohybu, celkové znehybnenie sa však neodporúča.

Po uplynutí doby vystavenia sa odstránia zvyšky testovanej látky, pokiaľ možno vodou alebo iným vhodným spôsobom očistenia kože.

Všetky zvieratá sa pozorujú denne a zaznamenávajú sa prejavy toxicity, vrátane času nástupu, závažnosti a trvania. Pozorovanie v klietke zahŕňa zmeny kože, srsti, očí, slizníc, dýchacieho systému a krvného obehu, zmeny funkcie autonómnej a centrálnej nervovej sústavy, somatomotoriky a správania. Meranie spotreby potravy a hmotnosti zvierat sa uskutočňuje týždenne. Je nutné zaistiť pravidelnú kontrolu zvierat, aby pokiaľ možno počas testu nedochádzalo k stratám zvierat, napr. v dôsledku kanibalizmu, autolýzy tkanív alebo chybou pri premiestňovaní zvierat. Po ukončení fázy vystavenia sa všetky zvieratá, ktoré prežili, s výnimkou zvierat satelitnej skupiny, pitvú. Zvieratá, ktoré sú pred smrťou, by sa mali vytriediť, humánne usmrtiť a pitvať.

U všetkých zvierat, včítane kontrolných, sa zvyčajne uskutočňujú nasledujúce vyšetrenia:

a) Oftalmologické vyšetrenie pomocou oftalmoskopom alebo rovnakého vhodného prístroja by sa malo vykonať pred vystavením testovanej látke a na konci štúdie, najlepšie u všetkých zvierat, aspoň však v skupine s najvyššou dávkou a v kontrolnej skupine. Ak sa na konci testu zistia zmeny na očiach, vyšetria sa všetky zvieratá.

b) Na konci testu sa musia vykonať hematologické vyšetrenia, ktoré majú zahŕňať hodnotu hematokrytu, koncentráciu hemoglobínu, počet erytrocytov, leukocytov, diferenciálny obraz, hemokoagulačné parametre ako testy zrážania krvi, zmeria sa napríklad čas zrážania, protrombínový čas, tromboplastínový čas alebo počet trombocytov.

▼B

c) Na konci testu by sa mali vykonať biochemické analýzy krvi. Pre tieto štúdie je vhodné analyzovať koncentráciu elektrolytov, metabolizmus glycidov, funkciu pečene a ľadvín. Výber špecifických testov bude odvodený z pozorovania spôsobu účinku látky. Navrhované vyšetrenia zahŕňajú stanovenie vápniku, fosforu, chloridov, sodíku, draslíku, glukózy na lačno (s pôstnou periodou určenou pre druh zvierať a), hladiny sérovej glutamát-pyruvát transaminázy ([1]), glutamátoxalacetáttransaminázy ([2]), ornitíndekarboxylázy, gamaglutamyltranspeptidázy, dusíku močoviny, albumínu, kreatinínu, celkového bilirubínu a celkových sérových bielkovín. Medzi ďalšie stanovenia, ktoré môžu byť nevyhnutné pre správne toxikologické hodnotenie, patrí stanovenie lipidov, hormónov, rovnováhy kyselín a zásad, methemoglobínu a aktivity cholinesterázy. Dodatočné biochemické analýzy môžu byť použité, ak je nevyhnutné prehĺbenie vyšetrenia pozorovaných toxických účinkov.

d) Analýza moču nie je spravidla potrebná, potrebná je vtedy, ak sa očakáva alebo pozoruje toxický účinok.

Ak údaje z predošlých testov boli nepreukázané, mal by sa brať ohľad na hematologické a biochemické parametre ešte pred začiatkom testu.

Autopsia

U všetkých zvierat zúčastňujúcich sa na teste sa musí vykonať kompletná autopsia skladajúca sa z vonkajšej prehliadky povrchu tela, všetkých telesných otvorov, lebečnej, hrudnej a brušnej dutiny, včítane ich obsahu. Pečeň, obličky, nadobličky a semenníky sa musia čo najskôr po sekcii odvážiť vlhké, aby sa predišlo vysušeniu. Nasledujúce orgány a tkanivá je nutné uchovať vo vhodnom médiu pre prípadné neskoršie histopatologické vyšetrenia: všetky orgány s makroskopickými zmenami, mozog – vrátane medula/pons, kôry malého a veľkého mozgu, hypofýza, štítna žľaza/prištitna žľaza, všetky týmusové tkanivá, (priedušnice), pľúca, srdce, aorta, slinné žľazy, pečeň, slezina, obličky, nadobličky, pankreas, gonády, maternica, akcesórne pohlavné orgány, žlčník (ak je prítomný), ezofagus, žalúdok, dvanástnik, jejunum, ileum, caecum, kolon, rektum, močový mechúr, reprezentatívne lymfatické uzliny, (samičie prsné žľazy), (svalstvo stehna), nervy periférneho systému, (oči), (hrudná kosť s kostnou dreňou), (femur včítane povrchu kĺbu), (miecha v troch úrovniach – oblasť krku, toraxu a bedier) a (extraorbitálna slzná žľaza). Tkanivá uvedené v zátvorkách sa vyšetrujú iba v prípade, ak je možné na ich postihnutie usudzovať na základe príznakov toxicity alebo pokiaľ súvisia s cieľovým orgánom.

Histopatologické vyšetrenie

a) Kompletné histopatologické vyšetrenie normálnej a exponovanej kože, orgánov a tkanív sa uskutoční u všetkých zvierat kontrolnej skupiny a u zvierat skupiny, ktorým bola aplikovaná najvyššia dávka.

b) Vyšetria sa všetky orgány s makroskopickými zmenami.

([1]) V súčasnosti známa ako sérová alanín aminotransferáza.
([2]) V súčasnosti známa ako sérová aspartát aminotransferáza.

▼B

c) Vyšetria sa cieľové orgány zvierat ostatných dávkových skupín.

d) Ak sa použijú potkany, pľúca zvierat v skupinách s nízkou a strednou koncentráciou sa histopatologicky vyšetria k zisteniu príznakov infekcie, aby to umožnilo vhodné posúdenie zdravotného stavu zvierat. Uváži sa vhodnosť histopatologického vyšetrenia pečene a obličiek u zvierat týchto skupín. Ďalšie histopatologické vyšetrenie sa u zvierat týchto skupín nesmie uskutočňovať rutinne, musí sa však uskutočniť vždy na orgánoch, na ktorých boli zistené zmeny v skupine s najvyššou koncentráciou.

e) U zvierat satelitnej skupiny sa musia histopatologicky vyšetriť tie tkanivá a orgány, ktoré vo vystavených skupinách reagujú na testovanú látku.

2. **ÚDAJE**

Údaje by sa mali zhrnúť do tabuľky, pričom sa uvedie u každej pokusnej skupiny počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat so zmenami, druh zmien, ako aj percento zvierat pre každý druh zmeny. Výsledky sa vyhodnotia vhodným štatistickým postupom. Môže byť použitá akákoľvek uznávaná štatistická metóda.

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu obsahuje, pokiaľ možno, tieto informácie:

— živočíšny druh, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo,

— podmienky testu,

— expozičné koncentrácie (včítane pomocnej látky, ak je použitá) a koncentrácie,

— údaje o toxických reakciách podľa pohlavia a dávky,

— koncentrácie bez účinku, pokiaľ je možné ju stanoviť,

— čas úmrtia počas experimentu, prípadne údaj o prežití zvierat do konca testu,

— opis toxických alebo iných účinkov,

— čas, keď boli pozorované jednotlivé abnormálne príznaky a ich ďalší vývoj,

— údaje o spotrebe potravy a o telesnej hmotnosti,

— oftalmologické nálezy,

— uskutočnené hematologické vyšetrenia a ich výsledky,

— uskutočnené biochemické vyšetrenia a ich výsledky (včítane výsledkov prípadných analýz moču),

— sekčné nálezy,

▼B

— podrobný opis všetkých histopatologických nálezov,

— štatistické vyhodnotenie výsledkov tam, kde je to možné,

— diskusia k výsledkom,

— vyhodnotenie výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

▼M4

B.29. **SUBCHRONICKÁ INHALAČNÁ TOXICITA: 90-DŇOVÁ ŠTÚDIA**

ZHRNUTIE

Táto revidovaná testovacia metóda B.29 bola vypracovaná s cieľom dôkladne opísať inhalačnú toxicitu testovanej chemikálie počas subchronického trvania (90 dní) a poskytnúť podrobné údaje pre kvantitatívne hodnotenie inhalačného rizika. Skupiny desiatich samcov a desiatich samíc hlodavcov sú na šesť hodín denne počas 90 dní (13 týždňov) exponované a) testovanej chemikálii pri troch alebo viacerých úrovniach koncentrácie, b) filtrovanému vzduchu (negatívna kontrola) a/alebo c) nosiču (kontrola pomocou nosiča). Zvieratá sú zvyčajne exponované päť dní v týždni, ale je povolená aj expozícia na sedem dní v týždni. Testujú sa vždy samce aj samice, môžu však byť vystavované rôznym úrovniam koncentrácie, ak je známe, že jedno z pohlaví je voči danej testovanej chemikálii vnímavejšie. Táto metóda poskytuje vedúcemu štúdie flexibilitu, aby mohol zahrnúť satelitné skupiny (reverzibilita), priebežné utratenie, bronchoalveolárnu laváž (BAL), neurologické testy a doplnkové hodnotenia klinickej patológie a histopatologické hodnotenia s cieľom dôkladnejšie charakterizovať toxicitu testovanej chemikálie.

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov TG 413 (2009). Pôvodné Usmernenia na vykonávanie testov subchronickej inhalačnej toxicity 413 (TG 413) boli prijaté v roku 1981 (1). Táto testovacia metóda B.29 [ako rovnocenná verzia revidovaných usmernení TG 413 (2009)] bola aktualizovaná, aby odrážala stav vedy a spĺňala súčasné a budúce regulačné potreby.

2. Štúdie subchronickej inhalačnej toxicity sa primárne využívajú na odvodenie regulačných koncentrácií pre hodnotenie rizík pre pracovníkov v prostredí pracoviska. Používajú sa aj na hodnotenie rizík súvisiacich s bývaním ľudí, ich prepravou a životným prostredím. Táto metóda umožňuje opísať nepriaznivé účinky po opakovanej dennej inhalačnej expozícii testovanej chemikálii počas 90 dní (približne 10 % dĺžky života potkana). Údaje odvodené zo štúdií subchronickej inhalačnej toxicity možno použiť pri kvantitatívnom hodnotení rizík a pri výbere koncentrácií pre chronické štúdie. Táto testovacia metóda nie je špecificky určená na testovanie nanomateriálov. Vymedzenie pojmov použitých v súvislosti s touto testovacou metódou je uvedené na konci tejto kapitoly a v usmerňovacom dokumente (GD) 39 (2).

ÚVODNÉ ÚVAHY

3. Pred samotným vykonaním štúdie testovacie laboratórium zváži všetky dostupné informácie o testovanej chemikálii s cieľom zlepšiť kvalitu štúdie a minimalizovať využívanie zvierat. Informácie, ktoré pomôžu pri výbere vhodných testovacích koncentrácií, zahŕňajú identitu, chemickú štruktúru a fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie; výsledky všetkých testov toxicity *in vitro* alebo *in vivo*; predpokladané použitie (použitia) a potenciál pre expozíciu ľudí; dostupné údaje (Q)SAR, toxikologické údaje o štrukturálne príbuzných látkach a údaje odvodené z iných štúdií opakovanej expozície. Ak sa očakávajú alebo ak sa v priebehu štúdie objavia príznaky neurotoxicity, vedúci štúdie môže rozhodnúť o zahrnutí vhodných hodnotení, ako je napríklad funkčná pozorovacia batéria (FOB) a meranie motorickej aktivity. Aj keď je pri určitých testoch rozhodujúce načasovanie expozícií, tieto dodatočné činnosti nesmú narušiť základný plán štúdie.

▼M4

4. Riedenie žieravých alebo dráždivých testovaných chemikálií sa môže testovať pri koncentráciách, ktoré budú vykazovať želanú mieru toxicity. Bližšie informácie sú k dispozícii v dokumente GD 39 (2). Pri vystavovaní zvierat pôsobeniu týchto materiálov musia byť cieľové koncentrácie dostatočne nízke, aby nespôsobovali výraznú bolesť ani utrpenie, a zároveň dostatočné na predĺženie krivky závislosti reakcie od koncentrácie na úroveň, na ktorej sa zabezpečí regulačný a vedecký cieľ testu. Tieto koncentrácie by sa mali vybrať v závislosti od jednotlivých prípadov, pokiaľ možno podľa vhodne navrhnutej štúdie na zistenie rozsahu, ktorá poskytuje informácie o kritickom parametri, každom prahu dráždivosti a čase nástupu príznakov (pozri odseky 11 – 13). Je potrebné zdôvodniť výber koncentrácie.

5. Moribundné zvieratá alebo zvieratá, ktoré majú očividne silné bolesti alebo vykazujú pretrvávajúce príznaky silného utrpenia, by sa mali humánnym spôsobom usmrtiť. Moribundné zvieratá sa posudzujú rovnako ako zvieratá, ktoré uhynú počas testovania. Kritériá na rozhodnutie usmrtiť moribundné alebo silne trpiace zvieratá a usmernenie o uznaní predvídateľnej alebo nastávajúcej smrti sú predmetom usmerňovacieho dokumentu OECD o humánnych parametroch (Humane Endpoints Guidance Document) (3).

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

6. Používajú sa zdravé mladé dospelé hlodavce bežne používaných laboratórnych kmeňov. Preferovaným druhom je potkan. Použitie iných druhov je potrebné zdôvodniť.

Príprava zvierat

7. Používajú sa samice, ktoré nikdy nevrhli mláďatá a sú negravidné. V deň randomizácie majú byť zvieratá mladé dospelé jedince vo veku sedem až deväť týždňov. Telesná hmotnosť má byť v rozsahu ± 20 % priemernej hmotnosti každého pohlavia. Zvieratá sú náhodne vybraté, označené tak, aby sa umožnila jednotlivá identifikácia, a držia sa v klietkach aspoň päť dní pred začiatkom testu, aby sa im umožnila aklimatizácia na laboratórne podmienky.

Chov zvierat

8. Zvieratá musia byť jednotlivo identifikované, najlepšie pomocou podkožných transpondérov, aby sa zjednodušilo pozorovanie a zamedzilo zámenám. Teplota miestnosti, kde sa pokusné zviera chová, by mala byť 22 ± 3 °C. Relatívna vlhkosť by sa v ideálnom prípade mala udržiavať v rozsahu od 30 do 70 %, hoci to nemusí byť možné, ak sa ako nosič používa voda. Pred a po expozícii sú zvieratá zvyčajne umiestnené v klietkach v skupinách podľa pohlavia a koncentrácie, ale počet zvierat v jednej klietke by nemal prekážať bezproblémovému pozorovaniu každého zvieraťa, pričom by sa mali minimalizovať straty súvisiace so vzájomným požieraním alebo bojom jedincov. V prípade, že sa použije iba expozícia oblasti nosa, môže byť potrebné, aby sa zvieratá aklimatizovali na skúmavky obmedzujúce pohyb. Obmedzujúce skúmavky by nemali zvieratám spôsobovať neprimeraný stres súvisiaci s fyzikálnymi vlastnosťami, teplotou alebo obmedzením pohybu. Obmedzenie môže mať vplyv na fyziologické sledované parametre, ako sú telesná teplota (hypertermia) a/alebo respiračný minútový objem. Ak sú k dispozícii všeobecné údaje, podľa ktorých k takýmto zmenám nedochádza vo veľkej miere, potom skúmavky nie je potrebné vopred prispôsobiť. Zvieratá vystavené účinkom aerosólu celým telom by sa mali v priebehu expozície umiestniť samostatne, aby sa zabránilo filtrovaniu testovaného aerosólu cez srsť ostatných zvierat v klietke. S výnimkou času trvania expozície sa na kŕmenie môže používať bežné a osvedčené laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou miestnej pitnej vody. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy.

▼M4

Inhalačné komory

9. Pri výbere inhalačnej komory by sa mal vziať do úvahy charakter testovanej chemikálie a predmet testu. Uprednostňuje sa expozícia oblasti nosa (pričom tento pojem zahŕňa expozíciu hlavy, nosa alebo pysku). Vo všeobecnosti sa pri štúdiách kvapalných alebo tuhých aerosólov a pár, ktoré môžu kondenzovať a vytvárať aerosóly, uprednostňuje expozícia oblasti nosa. Špeciálne ciele štúdie možno lepšie dosiahnuť použitím expozície celého tela, ale tento krok je potrebné v správe o štúdii odôvodniť. Na zabezpečenie stability prostredia pri používaní komory na expozíciu celého tela by celkový objem testovaných zvierat nemal presiahnuť 5 % objemu komory. Princípy metód expozície celého tela a oblasti nosa a ich konkrétne výhody a nevýhody sú opísané v dokumente GD 39 (2).

ŠTÚDIE TOXICITY

Limitné koncentrácie

10. Na rozdiel od štúdií akútnej toxicity nie sú pre štúdie subchronickej inhalačnej toxicity stanovené žiadne limitné koncentrácie. Pri maximálnej testovanej koncentrácii je potrebné zvážiť: 1. maximálnu dosiahnuteľnú koncentráciu; 2. najhorší možný prípad úrovne expozície ľudí; 3. potrebu zachovať primeraný prísun kyslíka a/alebo 4. otázky týkajúce sa dobrých životných podmienok zvierat. V prípade chýbajúcich limitov založených na údajoch sa môžu použiť akútne limity podľa nariadenia (ES) č. 1272/2008 (13) (t. j. až do maximálnej koncentrácie 5 mg/l v prípade aerosólov, 20 mg/l v prípade pár a 20 000 ppm v prípade plynov); pozri dokument GD 39 (2). Ak je nutné prekročiť tieto limity pri testovaní plynov alebo vysokoprchavých testovaných chemikálií (napr. chladiace látky), je potrebné uviesť odôvodnenie. Z limitnej koncentrácie by sa mala vyvodiť jednoznačná toxicita bez toho, aby sa zvieratám spôsoboval neprimeraný stres alebo aby bola ovplyvnená dĺžka ich života (3).

Štúdia na zistenie rozsahu

11. Pred začiatkom základnej štúdie je zvyčajne potrebné vykonať štúdiu na zistenie rozsahu. Štúdia na zistenie rozsahu je komplexnejšia ako predbežná štúdia, lebo sa neobmedzuje na výber koncentrácie. Poznatky získané zo štúdie na zistenie rozsahu môžu viesť k úspešnej základnej štúdii. Štúdia na zistenie rozsahu môže napríklad poskytnúť technické informácie o analytických metódach, rozdelení veľkosti častíc, odhalení toxických mechanizmov, klinickej patológii a histopatologických údajoch a odhadoch koncentrácií NOAEL a MTC v základnej štúdii. Vedúci štúdie sa môže rozhodnúť pre štúdiu na zistenie rozsahu s cieľom identifikovať prah dráždivosti dýchacích ciest (napr. histopatológiou dýchacích ciest, testovaním fungovania pľúc alebo bronchoalveolárnou lavážou), hornú koncentráciu tolerovanú bez toho, aby spôsobovala zvieratám neprimeraný stres, a parametre, ktoré najlepšie charakterizujú toxicitu testovanej chemikálie.

12. Štúdia na zistenie rozsahu môže pozostávať z jednej alebo viacerých úrovní koncentrácie. V závislosti od zvolených parametrov sa každej úrovni koncentrácie vystaví tri až šesť samcov a tri až šesť samíc. Štúdia na zistenie rozsahu by mala trvať minimálne päť dní a zvyčajne nie viac ako 28 dní. V správe o štúdii sa uvedú dôvody výberu koncentrácií pre základnú štúdiu. Cieľom základnej štúdie je preukázať vzťah koncentrácie a reakcie založený na parametri, ktorý je podľa očakávaní najcitlivejší. Nízka koncentrácia by mala ideálne predstavovať hladinu bez pozorovaného nepriaznivého účinku, zatiaľ čo z vysokej koncentrácie by sa mala vyvodiť jednoznačná toxicita bez toho, aby sa zvieratám spôsoboval neprimeraný stres alebo aby bola ovplyvnená dĺžka ich života (3).

▼M4

13. Pri výbere úrovní koncentrácie pre štúdiu na zistenie rozsahu je potrebné zvážiť všetky dostupné informácie vrátane vzťahov štruktúry a aktivity a údajov o podobných látkach (pozri odsek 3). Štúdia na zistenie rozsahu môže potvrdiť/vyvrátiť parametre, ktoré sa považujú za najcitlivejšie mechanisticky založené parametre, napr. cholínesterázna inhibícia prostredníctvom organofosfátov, tvorba methemoglobínu prostredníctvom erytrocytotoxických činiteľov, hormóny štítnej žľazy (T_3, T_4) v prípade látok toxických pre štítnu žľazu, proteín, LDH alebo neutrofily pri bronchoalveolárnej laváži v prípade neškodných slabo rozpustných častíc alebo aerosólov dráždivých pre pľúca.

Základná štúdia

14. Základná štúdia subchronickej toxicity vo všeobecnosti pozostáva z troch úrovní koncentrácie a podľa potreby aj zo súbežných negatívnych (vzduchových) kontrol a/alebo kontrol nosiča (pozri odsek 18). Pri výbere vhodných úrovní expozície je potrebné použiť všetky dostupné údaje vrátane výsledkov štúdií systémovej toxicity, metabolizmu a kinetiky (osobitne treba dbať na to, aby sa nepoužívali vysoké úrovne koncentrácie, ktoré nasycujú kinetické procesy). Každá testovacia skupina je zložená z desiatich samcov a desiatich samíc hlodavcov, ktoré sú exponované testovanej chemikálii šesť hodín denne päť dní v týždni počas 13 týždňov (celkové trvanie štúdie 90 dní). Zvieratá môžu byť pôsobeniu chemikálie vystavené aj sedem dní v týždni (napr. pri testovaní inhalovaných liekov). Ak je jedno z pohlaví vnímavejšie na testovanú chemikáliu, môžu byť obe pohlavia vystavené rôznym úrovniam koncentrácie, aby sa optimalizovala reakcia na koncentráciu podľa opisu v odseku 15. Ak sa v prípade iných hlodavcov ako potkanov použije expozícia oblasti nosa, maximálne trvanie expozície je možné prispôsobiť s cieľom minimalizovať druhovo špecifické utrpenie. Pri použití intervalu expozície v trvaní menej ako šesť hodín denne alebo ak je potrebné vykonať štúdiu expozície celého tela s dlhým intervalom (napr. 22 hodín denne), treba uviesť odôvodnenie (pozri dokument GD 39) (2). Počas trvania expozície by sa zviera nemalo kŕmiť, ak expozícia nepresiahne šesť hodín. V priebehu expozície celého tela sa zvieraťu môže podať voda.

15. Pomocou vybratých cieľových koncentrácií by sa mal identifikovať cieľový orgán (orgány) a preukázať zrejmá reakcia na koncentráciu:

— vysoká úroveň koncentrácie by mala mať za následok toxické účinky, ale nemala by spôsobiť pretrvávajúce príznaky ani letalitu, ktoré by znemožnili zmysluplné hodnotenie,

— stredná úroveň (úrovne) koncentrácie by sa mala podávať v takých odstupoch, aby viedla k stupňovaniu toxických účinkov medzi dávkami nízkej a vysokej koncentrácie,

— nízka úroveň koncentrácie by mala vyvolať malé alebo žiadne príznaky toxicity.

Priebežné utratenie

16. Ak sa plánuje priebežné utrácanie zvierat, počet zvierat pri každej úrovni expozície by sa mal zvýšiť o počet, ktorý sa má utratiť pred dokončením štúdie. Priebežné utrácanie zvierat treba odôvodniť, pričom tento postup by mal byť náležite podložený štatistickými analýzami.

▼M4

Satelitná štúdia (štúdia reverzibility)

17. Satelitná štúdia (štúdia reverzibility) sa môže použiť na pozorovanie reverzibility, pretrvávania alebo oneskoreného výskytu toxicity počas primerane dlhého obdobia po skončení testovania, najmenej však počas 14 dní. Satelitné skupiny (reverzibility) pozostávajú z desiatich samcov a desiatich samíc, ktoré sú exponované súbežne s pokusnými zvieratami v základnej štúdii. Skupiny satelitnej štúdie (reverzibility) sú vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie pri najvyššej úrovni koncentrácie a súbežne sa podľa potreby vykonávajú vzduchové kontroly a/alebo kontroly nosiča (pozri odsek 18).

Kontrolné zvieratá

18. S kontrolnými zvieratami súbežných negatívnych (vzduchových) kontrol sa zaobchádza rovnako ako so zvieratami testovacej skupiny s tou výnimkou, že sú vystavené filtrovanému vzduchu a nie testovanej chemikálii. Ak sa pri vytváraní testovacieho ovzdušia používa voda alebo iná látka, do štúdie je potrebné namiesto negatívnej (vzduchovej) kontrolnej skupiny zahrnúť kontrolnú skupinu nosiča. Vždy, keď je to možné, sa ako nosič použije voda. Ak sa ako nosič použije voda, kontrolné zvieratá by mali byť exponované vzduchu s rovnakou relatívnou vlhkosťou ako skupiny exponované testovanej chemikálii. Výber vhodného nosiča by mal byť založený na riadne vykonanej predbežnej štúdii alebo na historických údajoch. Ak nie je toxicita nosiča dostatočne známa, vedúci štúdie sa môže rozhodnúť použiť negatívnu (vzduchovú) kontrolu aj kontrolu nosiča, ale tento postup sa vyslovene neodporúča. Ak z predchádzajúcich údajov vyplýva, že nosič nie je toxický, negatívna (vzduchová) kontrolná skupina nie je potrebná a mala by sa použiť iba kontrola nosiča. Ak sa pri predbežnej štúdii testovanej chemikálie pripravenej v nosiči nezistí žiadna toxicita, znamená to, že nosič pri testovanej koncentrácii nie je toxický a táto kontrola nosiča by sa mala použiť.

PODMIENKY EXPOZÍCIE

Podávanie koncentrácií

19. Zvieratá sú vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie vo forme plynu, pary, aerosólu alebo ich kombinácie. Fyzikálne skupenstvo, ktoré sa testuje, závisí od fyzikálno-chemických vlastností testovanej chemikálie, zvolených koncentrácií a/alebo najpravdepodobnejšej fyzikálnej formy pri manipulácii a používaní testovanej chemikálie. Hygroskopické a chemicky reaktívne testované chemikálie by sa mali testovať v podmienkach suchého vzduchu. Treba dbať na to, aby sa nevytvorili výbušné koncentrácie. Tuhé materiály môžu byť podrobené mechanickým procesom na zmenšenie veľkosti častíc. Ďalšie usmernenia sa nachádzajú v dokumente GD 39 (2).

Rozdelenie veľkosti častíc

20. Častice by sa mali rozdeliť podľa veľkosti v prípade všetkých aerosólov a pár, ktoré môžu kondenzovať a vytvárať aerosóly. Na umožnenie expozície všetkých relevantných oblastí dýchacej sústavy sa odporúčajú aerosóly so stredným aerodynamickým hmotnostným priemerom (MMAD) v rozsahu od 1 do 3 μm so štandardnou odchýlkou geometrického priemeru (σ_g) v rozsahu od 1,5 do 3,0 (4). Hoci by sa malo vynaložiť primerané úsilie na dodržanie tejto normy, pokiaľ túto podmienku nie je možné splniť, treba predložiť odborný posudok. Napríklad v prípade kovových dymov budú častice menšie, ako stanovuje táto norma, a nabité častice a vlákna môžu túto normu prekračovať.

▼M4

Príprava testovanej chemikálie v nosiči

21. V ideálnom prípade sa testovaná chemikália testuje bez nosiča. Ak je nevyhnutné použiť nosič, aby sa dosiahla vhodná koncentrácia a veľkosť častíc testovanej chemikálie, uprednostňuje sa voda. Vždy, keď je testovaná chemikália rozpustená v nosiči, je potrebné preukázať jej stabilitu.

MONITOROVANIE PODMIENOK EXPOZÍCIE

Prúdenie vzduchu v komore

22. Prúdenie vzduchu cez expozičnú komoru by sa počas každej expozície malo dôkladne kontrolovať, nepretržite monitorovať a zaznamenávať aspoň raz za hodinu. Monitorovanie koncentrácie testovacieho ovzdušia v reálnom čase (alebo dočasnej stability) je integrálne meranie všetkých dynamických parametrov a poskytuje nepriamy prostriedok kontroly všetkých relevantných dynamických inhalačných parametrov. Ak sa koncentrácia monitoruje v reálnom čase, frekvencia meraní prúdenia vzduchu sa môže obmedziť na jedno meranie na expozíciu za deň. Je potrebné venovať osobitnú pozornosť tomu, aby v komorách na expozíciu oblasti nosa nedochádzalo k opätovnému vdychovaniu. Koncentrácia kyslíka by mala byť minimálne 19 % a koncentrácia oxidu uhličitého by nemala presiahnuť 1 %. Ak existuje dôvod domnievať sa, že túto normu nie je možné splniť, koncentrácie kyslíka a oxidu uhličitého by sa mali zmerať. Ak merania v prvý deň expozície preukážu, že úrovne týchto plynov sú správne, ďalšie merania nie sú nutné.

Teplota komory a relatívna vlhkosť

23. Teplotu v komore je potrebné udržiavať na úrovni 22 ± 3 °C. Relatívnu vlhkosť v dýchacej zóne zvierat pri expozícii oblasti nosa aj pri expozícii celého tela je potrebné počas každej expozície nepretržite monitorovať a podľa možnosti raz za hodinu zaznamenávať. Relatívna vlhkosť by sa podľa možnosti mala udržiavať v rozsahu od 30 do 70 %, ale môže sa stať, že táto hodnota bude nedosiahnuteľná (napr. v prípade testovania zmesí na báze vody) alebo nemerateľná z dôvodu interferencie testovanej chemikálie a testovacej metódy.

Testovaná chemikália: nominálna koncentrácia

24. Vždy, keď je to možné, by sa mala vypočítať a zaznamenať nominálna koncentrácia expozície v komore. Nominálna koncentrácia je hmotnosť vytvorenej testovanej chemikálie vydelená celkovým objemom vzduchu, ktorý prešiel systémom inhalačnej komory. Nominálna koncentrácia sa nepoužíva na charakterizáciu expozície zvierat, ale porovnanie nominálnej a skutočnej koncentrácie vypovedá o účinnosti vytvárania testovacieho systému, a teda sa môže použiť na zistenie problémov s tvorbou.

Testovaná chemikália: skutočná koncentrácia

25. Skutočná koncentrácia je koncentrácia testovanej chemikálie odobratej z dýchacej zóny zvierat v inhalačnej komore. Skutočné koncentrácie možno získať špecifickými metódami (napr. priamym odberom vzorky, adsorpčnými alebo chemicky reaktívnymi metódami a následnou analytickou charakterizáciou) alebo nešpecifickými metódami, ako je gravimetrická filtrová analýza. Použitie gravimetrickej analýzy je prípustné iba v prípade jednozložkových práškových aerosólov alebo aerosólov kvapalín s nízkou prchavosťou, pričom je potrebné túto analýzu podložiť primeranými testovými charakterizáciami predbežných štúdií týkajúcich sa konkrétnej chemikálie. Koncentráciu viaczložkových práškových aerosólov

▼M4

takisto možno stanoviť prostredníctvom gravimetrickej analýzy. V tom prípade sú však potrebné analytické údaje, ktoré preukazujú, že zloženie materiálu vo vzduchu je podobné ako zloženie východiskového materiálu. Ak tieto informácie nie sú dostupné, môže byť potrebná opätovná analýza testovanej chemikálie (ideálne v jej skupenstve v ovzduší) v pravidelných intervaloch v priebehu štúdie. V prípade aerosólových látok, ktoré sa môžu vyparіť alebo môžu sublimovať, by sa malo preukázať, že všetky fázy sa zhromaždili pomocou zvolenej metódy.

26. Ak je to možné, počas celej štúdie by sa mala použiť jedna dávka testovanej chemikálie, pričom testovaná vzorka by sa mala uskladniť za podmienok, za ktorých sa zachová jej čistota, homogenita a stabilita. Pred začatím štúdie by mala byť k dispozícii charakterizácia testovanej chemikálie vrátane jej čistoty a, ak je to technicky možné, identity a množstiev identifikovaných kontaminantov a prímesí. Charakterizáciu možno preukázať napríklad týmito údajmi: retenčný čas a relatívna plocha píku, molekulová hmotnosť získaná pomocou analýzy hmotnostnej spektrometrie alebo plynovej chromatografie alebo iné odhady. Hoci za identitu testovanej vzorky testovacie laboratórium nenesie zodpovednosť, je vhodné, aby testovacie laboratórium aspoň čiastočne potvrdilo charakterizáciu poskytnutú dodávateľom (napr. farbu, fyzikálne skupenstvo atď.).

27. Podľa možnosti je potrebné udržiavať ovzdušie pri expozícii konštantné. Na preukázanie stability podmienok expozície sa môže použiť zariadenie na monitorovanie v reálnom čase, ako napríklad aerosólový fotometer pre aerosóly alebo komplexný uhľovodíkový analyzátor pre pary. Skutočná koncentrácia v komore by sa mala merať aspoň tri razy v každý deň expozície a pri každej úrovni expozície. Ak to pre nízky prietok vzduchu alebo nízke koncentrácie nie je možné, je prijateľný jeden odber vzorky počas intervalu expozície. V takom prípade by sa mala táto vzorka podľa možnosti odoberať za celé trvanie expozície. Jednotlivé vzorky koncentrácie v komore by sa nemali od strednej koncentrácie v komore odchýliť o viac ako ± 10 % v prípade plynov a pár a o viac ako ± 20 % v prípade kvapalných alebo tuhých aerosólov. Čas na dosiahnutie rovnováhy v komore (t_{95}) by sa mal vypočítať a zaznamenať. Interval expozície zahŕňa čas, keď sa testovaná chemikália tvorí. Zohľadňuje sa pri tom čas potrebný na dosiahnutie rovnováhy v komore (t_{95}) a čas rozpadu. Usmernenia k odhadovaniu t_{95} sú uvedené v dokumente GD 39 (2).

28. V prípade veľmi komplexných zmesí tvorených plynmi/parami a aerosólov (napr. spaľovacieho ovzdušia a testovaných chemikálií poháňaných účelovými výrobkami/zariadeniami koncového použitia) sa v inhalačnej komore môže každá fáza správať inak. Preto by sa pre každú fázu (plyn/para a aerosól) mala vybrať aspoň jedna látka slúžiaca ako ukazovateľ (analyt), obyčajne hlavná aktívna zložka v zmesi. Ak je testovaná chemikália zmes, v správe by sa mala uviesť analytická koncentrácia celej zmesi, nielen aktívnej látky alebo látky slúžiacej ako ukazovateľ (analyt). Ďalšie informácie týkajúce sa skutočných koncentrácií sú uvedené v dokumente GD 39 (2).

Testovaná chemikália: rozdelenie veľkosti častíc

29. Rozdelenie veľkosti častíc aerosólov by sa pri každej úrovni koncentrácie malo stanoviť aspoň raz za týždeň, a to pomocou kaskádového impaktora alebo alternatívneho prístroja, ako je napríklad aerodynamický spektrometer častíc (APS). Ak možno preukázať rovnocennosť výsledkov získaných pomocou kaskádového impaktora a alternatívneho prístroja, potom sa alternatívny prístroj môže používať počas celej štúdie.

▼M4

30. Druhé zariadenie, ako je gravimetrický filter alebo impinger/premývačka, by sa malo použiť súbežne s hlavným prístrojom na potvrdenie zachytávacej účinnosti hlavného prístroja. Hmotnostná koncentrácia získaná analýzou veľkosti častíc by mala byť v rozsahu primeraných limitov hmotnostnej koncentrácie získanej filtrovou analýzou [pozri dokument GD 39 (2)]. Ak možno preukázať rovnocennosť pri všetkých koncentráciách testovaných v počiatočnej fáze štúdie, nie je potrebné vykonávať ďalšie potvrdzujúce merania. V záujme zabezpečenia dobrých životných podmienok pre zvieratá by sa mali prijať opatrenia na minimalizáciu nejednoznačných údajov, ktoré môžu viesť k potrebe opakovať štúdiu.

31. Rozdelenie veľkosti častíc by sa malo vykonať v prípade pár, ak existuje možnosť, že kondenzácia pary môže mať za následok tvorbu aerosólu, alebo ak sa v ovzduší pár zistia častice s potenciálom zmiešaných fáz.

POZOROVANIA

32. Zvieratá by sa mali pred, počas a po skončení expozície klinicky pozorovať. V závislosti od reakcie zvierat počas expozície môžu byť potrebné častejšie pozorovania. Ak pozorovaniu zvierat bráni používanie skúmaviek obmedzujúcich pohyb zvierat, slabo osvetlených komôr na expozíciu celého tela alebo nepriehľadné ovzdušie, zvieratá by sa mali dôkladne preskúmať po skončení expozície. Na základe pozorovaní pred expozíciou v nasledujúcom dni možno zhodnotiť akúkoľvek reverzibilitu alebo zhoršenie toxických účinkov.

33. Všetky pozorovania sa zaznamenávajú, pričom každé zviera má individuálny záznam. Keď sa zvieratá usmrtia z humánnych dôvodov alebo sa nájdu uhynuté, je potrebné čo možno najpresnejšie zaznamenať čas uhynutia.

34. Pozorovania v klietkach sa zameriavajú na zmeny kože a srsti, očí, slizníc, dýchania a krvného obehu, zmeny nervového systému a zmeny somatomotoriky a správania. Pozornosť sa zameriava na pozorovanie triašky, kŕčov, slinenia, hnačky, letargie, spánku a kómy. Meraním rektálnej teploty možno získať dôkazy svedčiace o reflexnej bradypney alebo hypo/hypertermii, ktoré súvisia s testovaním alebo s obmedzením pohybu. Protokol o štúdii môže zahŕňať ďalšie hodnotenia, ako je napríklad kinetika, biomonitorovanie, funkcia pľúc, zadržiavanie slabo rozpustných materiálov, ktoré sa hromadia v pľúcnom tkanive, a zmeny správania.

TELESNÉ HMOTNOSTI

35. Hmotnosť jednotlivých zvierat je potrebné zaznamenať krátko pred prvou expozíciou (deň 0), potom dvakrát týždenne (napríklad: piatky a pondelky, aby sa preukázalo zotavenie po víkende bez expozícií, alebo v časovom intervale, ktorý umožňuje hodnotenie systémovej toxicity) a v čase uhynutia alebo utratenia. Ak sa v prvých štyroch týždňoch neobjavia žiadne účinky, po zvyšok štúdie sa môže telesná hmotnosť merať raz za týždeň. Satelitné zvieratá (na štúdiu reverzibility, ak sa použijú) sa naďalej vážia raz za týždeň počas celého obdobia zotavovania. Na konci štúdie by sa všetky zvieratá mali krátko pred utratením odvážiť, aby sa získali neskreslené vypočítané pomery hmotnosti orgánov k telu.

SPOTREBA POTRAVY A VODY

36. Spotreba potravy by sa mala merať raz za týždeň. Môže sa merať aj spotreba vody.

▼M4

KLINICKÁ PATOLÓGIA

37. Hodnotenia klinickej patológie sa po utratení vykonávajú pri všetkých zvieratách vrátane kontrolných a satelitných zvierat (na štúdiu reverzibility). Je potrebné zaznamenať časový interval medzi skončením expozície a odberom krvi, najmä ak je rekonštitúcia sledovaného parametra rýchla. Odber vzoriek po skončení expozície je indikovaný pri tých parametroch, ktoré majú krátky biologický polčas v plazme (napr. COHb, CHE a MetHb).

38. V tabuľke 1 sa uvádza zoznam parametrov klinickej patológie, ktoré sa vo všeobecnosti požadujú pri všetkých toxikologických štúdiách. Rozbor moču sa bežne nevyžaduje, ale môže sa vykonať, ak sa na základe očakávanej alebo pozorovanej toxicity predpokladá, že bude užitočný. Vedúci štúdie sa môže rozhodnúť hodnotiť ďalšie parametre s cieľom lepšie charakterizovať toxicitu testovanej chemikálie (napr. cholínesteráza, lipidy, hormóny, acidobázická rovnováha, methemoglobín alebo Heinzove telieska, kreatinkináza, pomer myelocytov a erytrocytov, troponíny, plyny v arteriálnej krvi, laktátdehydrogenáza, sorbitol-dehydrogenáza, glutamat-dehydrogenáza a gama-glutamyl transpeptidáza).

Tabuľka 1

Štandardné parametre klinickej patológie

Hematológia	
Počet erytrocytov	Celkový počet leukocytov
Hematokrit	Diferenciálny počet leukocytov
Koncentrácia hemoglobínu	Počet trombocytov
Stredný korpuskulárny hemoglobín	Potenciál zrážania krvi (vyberte jednu z možností):
Stredný korpuskulárny objem	— Protrombínový čas
Koncentrácia stredného korpuskulárneho hemoglobínu	— Čas zrážania krvi
Retikulocyty	— Čiastočný tromboplastínový čas
Klinická chémia	
Glukóza (*)	Alanín-amintransferáza
Celkový cholesterol	Aspartát-aminotransferáza
Triglyceridy	Alkalická fosfatáza
Dusík z močoviny v krvi	Draslík
Celkový bilirubín	Sodík
Kreatinín	Vápnik
Celkový obsah bielkovín	Fosfor
Albumíny	Chloridy
Globulíny	
Rozbor moču (nepovinné)	
Vzhľad (farba a zakalenie)	Celkový obsah bielkovín
Objem	Glukóza
Špecifická hmotnosť alebo osmolalita	Krv/krvinky
pH	

(*) Keďže dlhé obdobie bez kŕmenia môže pri pokusných zvieratách v porovnaní s kontrolnými zvieratami viesť k skresleniu meraní glukózy, vedúci štúdie by mal určiť, či je primerané, aby sa zvieratá nekŕmili. Ak sa použije obdobie bez kŕmenia, malo by byť primerané použitému živočíšnemu druhu; pri potkanoch to môže byť 16 hodín (nočný pôst). Stanovenie glukózy nalačno sa môže vykonať po nočnom pôste počas posledného týždňa expozície alebo po nočnom pôste pred pitvou (v druhom prípade spolu so všetkými ostatnými parametrami klinickej patológie).

▼M4

39. Ak existuje dôkaz, že hlavným miestom usadzovania a zachytávania sú dolné dýchacie cesty (t. j. alveoly), ako metóda kvantitatívnej analýzy hypotetických parametrov účinnosti dávky zameranej na hypersenzitívnu pneumonitídu, zápal pľúc a fosfolipidózu sa môže zvoliť bronchoalveolárna laváž (BAL). Tá umožňuje primerane preskúmať priebežné zmeny alveolárneho poškodenia súvisiace so závislosťou reakcie od dávky. Z tekutiny bronchoalveolárnej laváže sa môže analyzovať celkový a diferenciálny počet leukocytov, celkový obsah bielkovín a laktát-dehydrogenáza. Ďalej sa môžu zvážiť parametre indikujúce lyzozomálne poškodenie, fosfolipidózu, fibrózu a dráždivé alebo alergické zápaly, ktoré môžu zahŕňať stanovenie zápalových cytokínov/chemokínov. Merania BAL vo všeobecnosti dopĺňajú výsledky histopatologických testov, nemôžu ich však nahradiť. Usmernenia o postupe pľúcnej laváže sú uvedené v dokumente GD 39 (2).

OFTALMOLOGICKÉ VYŠETRENIE

40. Pomocou oftalmoskopu alebo podobného vhodného zariadenia sa vykoná oftalmologické vyšetrenie očného pozadia, refrakčného systému oka, dúhovky a spojoviek pri všetkých zvieratách pred podaním testovanej chemikálie a po skončení expozície pri všetkých skupinách s vysokými koncentráciami a pri kontrolných skupinách. Ak sa zistia zmeny na oku, vyšetria sa všetky zvieratá v ostatných skupinách vrátane satelitnej skupiny (reverzibilita).

MAKROSKOPICKÁ PATOLÓGIA A ORGÁNOVÉ HMOTNOSTI

41. Všetky testované zvieratá vrátane tých, ktoré uhynú počas testu alebo sa vylúčia zo štúdie z dôvodu starostlivosti o zvieratá, sa podrobujú úplnému vykrveniu (ak je uskutočniteľné) a makroskopickej autopsii. Pri každom zvierati sa zaznamená čas medzi skončením poslednej expozície a utratením. Ak nie je možné vykonať autopsiu ihneď po objavení uhynutého zvieraťa, zviera sa schladí (nie zmrazí) na dostatočne nízku teplotu, aby sa minimalizovala autolýza. Autopsie by sa mali vykonať čo najskôr, zvyčajne v priebehu jedného alebo dvoch dní. Pri každom zvierati sa zaznamenajú všetky makroskopické patologické zmeny, pričom osobitná pozornosť sa venuje akýmkoľvek zmenám v dýchacej sústave.

42. V tabuľke 2 sa uvádza zoznam orgánov a tkanív, ktoré je počas makroskopickej pitvy potrebné zachovať vo vhodnom médiu na účely histopatologického vyšetrenia. O uchovaní orgánov a tkanív [v zátvorke] a všetkých ostatných orgánov a tkanív rozhodne vedúci štúdie. Orgány vyznačené **tučným písmom** by sa mali čo najskôr po disekcii upraviť a odvážiť v mokrom stave, aby sa zabránilo ich vyschnutiu. Štítna žľaza a nadsemenníky by sa mali vážiť iba v prípade potreby, lebo úprava artefaktov môže brániť histopatologickému hodnoteniu. Tkanivá a všetky orgány sa fixujú v 10 % formalínovom tlmivom roztoku alebo v inom vhodnom fixačnom prostriedku ihneď po vykonaní autopsie a nie skôr ako 24 – 48 hodín pred úpravou v závislosti od použitého fixačného prostriedku.

▼M4

Tabuľka 2

Orgány a tkanivá zachované počas makroskopickej pitvy

Nadobličky	Pažerák
Srdcovnica	[Čuchový bulbus]
Kostná dreň (a/alebo čerstvý aspirát)	**Vaječníky**
Mozog (vrátane častí predného mozgu, mozočka a predĺženej miechy/mosta)	Pankreas
Slepé črevo	Prištítne telieska
Hrubé črevo	Periférny nerv (sedací alebo tibiálny, podľa možnosti blízko svalu)
Dvanástnik	Hypofýza
[**Nadsemenníky**]	Prostata
[Oči (sietnica, očný nerv) a očné viečka]	Rektum
Stehnová kosť a kolenný kĺb	Slinné žľazy
Žlčník	Semenné mechúriky
[Harderove žľazy]	Koža
Srdce	Miecha (krčná, hrudná a lumbálna)
Ileum	**Slezina**
Lačník	Hrudná kosť
Obličky	Žalúdok
[Slzné žľazy (extraorbitálne)]	Zuby
Hrtan (tri úrovne vrátane základne epiglotis)	**Semenníky**
Pečeň	**Týmus**
Pľúca (všetky laloky na jednej úrovni vrátane hlavných priedušiek)	**Štítna žľaza**
Lymfatické uzliny z hilovej oblasti pľúc, najmä v prípade tuhých testovaných chemikálií so slabou rozpustnosťou. Pri detailnejších testoch a/alebo štúdiách s imunologickým zameraním sa môžu zvážiť ďalšie lymfatické uzliny, napr. z mediastinálnych, cervikálnych/submandibulárnych a/alebo aurikulárnych oblastí.	[Jazyk]
	Priedušnica (najmenej dve úrovne vrátane jedného pozdĺžneho rezu cez karinu a jedného priečneho rezu)
Lymfatické uzliny (distálne od brány vstupu)	Močovod
Prsná žľaza (samičia)	Močová rúra
Sval (stehenný)	Močový mechúr
Nosohltanové tkanivá (aspoň štyri úrovne; jedna úroveň zahŕňa nosohltanovú trubicu a nosové lymfoidné tkanivo (NALT))	**Maternica**
	Cieľové orgány
	Všetky makroskopické poškodenia a hmotnosti

▼M4

43. Pľúca by sa mali odňať neporušené, odvážiť a napustiť vhodným fixačným prostriedkom pri tlaku 20 – 30 cm vody, aby sa zachovala ich štruktúra (5). Je potrebné odobrať rezy všetkých lalokov na jednej úrovni vrátane hlavných priedušiek, ale ak sa robí pľúcna laváž, mali by sa vykonať rezy nelavážovaného laloku na troch úrovniach (nie sériové rezy).

44. Preskúmajú sa najmenej štyri úrovne nosohltanových tkanív, z ktorých jedna by mala obsahovať nosohltanovú trubicu (5) (6) (7) (8) (9), aby sa umožnilo vhodné preskúmanie dlaždicového, prechodného (neriasinkového dýchacieho), dýchacieho (riasinkového dýchacieho) a čuchového epitelu a odvodného lymfatického tkaniva (NALT) (10) (11). Preskúmajú sa tri úrovne hrtana, pričom jedna z týchto úrovní by mala obsahovať základňu epiglotis (12). Je potrebné preskúmať aspoň dve úrovne priedušnice vrátane jedného pozdĺžneho rezu cez karinu bifurkácie extrapulmonárnych priedušiek a jedného priečneho rezu.

HISTOPATOLÓGIA

45. Pri kontrolných skupinách a skupinách s vysokými koncentráciami a pri všetkých zvieratách, ktoré uhynú alebo sú utratené počas štúdie, sa vykoná histopatológia všetkých orgánov a tkanív vymenovaných v tabuľke 2. Osobitná pozornosť by sa mala venovať dýchacím cestám, cieľovým orgánom a makroskopickým poškodeniam. Orgány a tkanivá, ktoré majú poškodenia v skupine s vysokými koncentráciami, sa preskúmajú pri všetkých skupinách. Vedúci štúdie sa môže rozhodnúť pre vykonanie histopatologických hodnotení pri ďalších skupinách s cieľom preukázať jednoznačnú reakciu na koncentráciu. Ak boli použité satelitné skupiny (reverzibilita), histopatologické hodnotenie sa vykoná v prípade všetkých tkanív a orgánov, pri ktorých boli v testovaných skupinách zistené účinky. Ak v skupine s vysokou expozíciou došlo k nadmernému predčasnému úhynu alebo iným problémom, ktoré spochybňujú významnosť údajov, je potrebné histopatologicky preskúmať najbližšiu nižšiu koncentráciu. Sledovanie nálezov pitvy by malo korelovať s mikroskopickými nálezmi.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

46. Je potrebné uviesť údaje o telesnej hmotnosti, spotrebe potravy, klinickej patológii, makroskopickej patológii, orgánových hmotnostiach a histopatológii jednotlivých zvierat. Údaje z klinických pozorovaní sa zhrnú v podobe tabuliek, kde sa uvedie pre každú pokusnú skupinu počet použitých zvierat, počet zvierat vykazujúcich špecifické príznaky toxicity, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu alebo ich usmrtili z humánnych dôvodov, čas uhynutia jednotlivých zvierat, opis a časový priebeh toxických účinkov a reverzibility a pitevné nálezy. Všetky výsledky, kvantitatívne aj náhodné, sa vyhodnotia primeranou štatistickou metódou. Možno použiť akúkoľvek všeobecne akceptovanú štatistickú metódu, pričom štatistické metódy je potrebné vybrať počas plánovania štúdie.

Správa o teste

47. Správa o teste by mala podľa potreby obsahovať tieto informácie:

Testované zvieratá a chov:

— opis podmienok v klietkach vrátane: počtu (alebo zmeny počtu) zvierat na klietku, výstelky, teploty prostredia a relatívnej vlhkosti, dĺžky svetlej fázy a identifikácie krmiva,

▼M4

— použité druhy/kmene a odôvodnenie použitia druhov iných ako potkany, môže sa uviesť zdroj a historické údaje, ak sa týkajú zvierat v podobných podmienkach expozície, umiestnenia a kŕmenia,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— metóda randomizácie,

— opis akýchkoľvek podmienok pred testovaním vrátane krmiva, karantény a liečby chorôb.

Testovaná chemická látka:

— fyzikálny charakter, čistota a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti (vrátane izomerizácie),

— identifikačné údaje a registračné číslo CAS (Chemical Abstract Services), ak je známe.

Nosič:

— odôvodnenie použitia nosiča a odôvodnenie výberu nosiča (ak je iný ako voda),

— historické alebo súčasné údaje preukazujúce, že nosič nemá vplyv na výsledky štúdie.

Inhalačná komora:

— podrobný opis inhalačnej komory vrátane objemu a nákresu,

— zdroj a opis zariadenia použitého na expozíciu zvierat, ako aj na vytvorenie ovzdušia,

— zariadenie na meranie teploty, vlhkosti, veľkosti častíc a skutočnej koncentrácie,

— zdroj vzduchu a použitý klimatizačný systém,

— metódy použité na kalibráciu zariadenia s cieľom zabezpečiť homogénne testovacie ovzdušie,

— rozdiel tlakov (pozitívny alebo negatívny),

— expozičné otvory na jednu komoru (v prípade expozície oblasti nosa), umiestnenie zvierat v komore (v prípade expozície celého tela),

— stabilita testovacieho ovzdušia,

— umiestnenie senzorov teploty a vlhkosti a odber vzorky testovacieho ovzdušia v komore,

— manipulácia s privádzaným/extrahovaným vzduchom,

— hodnoty prietoku vzduchu, prietok vzduchu na jeden expozičný otvor (v prípade expozície oblasti nosa) alebo množstvo zvierat na komoru (v prípade expozície celého tela),

— čas potrebný na dosiahnutie rovnováhy v inhalačnej komore (t95),

— počet zmien objemu za hodinu,

— meracie prístroje (ak sa použili).

Údaje o expozícii:

— odôvodnenie výberu cieľovej koncentrácie pre základnú štúdiu,

▼M4

— nominálne koncentrácie (celková hmotnosť testovanej chemikálie aplikovanej do inhalačnej komory vydelená objemom vzduchu, ktorý prešiel komorou),

— skutočné koncentrácie testovanej chemikálie zachytenej z dýchacej zóny zvierat, v prípade zmesí, ktoré vytvárajú heterogénne fyzikálne skupenstvá (plyny, pary, aerosóly) možno každé skupenstvo analyzovať samostatne,

— všetky koncentrácie vzduchu sa udávajú v hmotnostných jednotkách (mg/l mg/m^3 atď.), nie v objemových jednotkách (ppm, ppb atď.),

— rozdelenie veľkosti častíc, stredný aerodynamický hmotnostný priemer (MMAD) a štandardná odchýlka geometrického priemeru (σ_g) vrátane metód ich výpočtu. Jednotlivé analýzy veľkosti častíc sa uvedú v správe.

Podmienky testovania:

— podrobné informácie o príprave testovanej chemikálie vrátane podrobných údajov o všetkých postupoch použitých na zmenšenie veľkosti častíc tuhých materiálov alebo na prípravu roztokov testovanej chemikálie,

— opis (podľa možnosti spolu s nákresom) zariadenia použitého na vytvorenie testovacieho ovzdušia a na expozíciu zvierat testovaciemu ovzdušiu,

— podrobné informácie o zariadeniach použitých na monitorovanie teploty, vlhkosti a prúdenia vzduchu v komore (t. j. vývoj kalibračnej krivky),

— podrobné informácie o zariadeniach použitých pri odbere vzoriek na stanovenie koncentrácie v komore a rozdelenia veľkosti častíc,

— podrobné informácie o použitej chemickej analytickej metóde a o overení metódy (vrátane účinnosti výťažnosti testovanej chemikálie z prostriedku na odber vzorky),

— metóda randomizácie pri prideľovaní zvierat do testovacích a kontrolných skupín,

— údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu/zdroja krmiva, zdroja vody),

— odôvodnenie výberu testovacích koncentrácií.

Výsledky:

— tabuľkové spracovanie teploty, vlhkosti a prúdenia vzduchu v komore,

— tabuľkové spracovanie údajov o nominálnych a skutočných koncentráciách,

— tabuľkové spracovanie údajov o veľkosti častíc vrátane údajov o odbere vzoriek na analýzu, o rozdelení veľkosti častíc a o výpočtoch MMAD a σ_g,

— tabuľkové spracovanie získaných údajov o reakcii a úrovni koncentrácie pre každé zviera (t. j. zvieratá vykazujúce príznaky toxicity vrátane mortality, charakteru, závažnosti, času nástupu a trvania účinkov),

▼M4

— tabuľkové spracovanie hmotností jednotlivých zvierat,

— tabuľkové spracovanie spotreby potravy,

— tabuľkové spracovanie údajov klinickej patológie,

— pitevné nálezy a histopatologické nálezy pre každé zviera, ak sú k dispozícii.

Rozbor a interpretácia výsledkov:

— osobitný dôraz sa kladie na opis metód použitých na splnenie kritérií tejto testovacej metódy, napr. limitnej koncentrácie alebo veľkosti častíc,

— dýchateľnosť častíc vzhľadom na celkové zistenia sa uvedie, najmä ak nebolo možné splniť kritériá na veľkosť častíc,

— konzistencia metód použitých na stanovenie nominálnej a skutočnej koncentrácie a vzťah skutočnej koncentrácie k nominálnej koncentrácii sa uvedú v celkovom hodnotení štúdie,

— uvedie sa pravdepodobná príčina uhynutia a prevládajúci druh pôsobenia (systémové či lokálne),

— uvedie sa vysvetlenie, ak bolo potrebné humánnym spôsobom utratiť zvieratá, ktoré mali bolesti alebo vykazovali príznaky silného alebo pretrvávajúceho utrpenia, v súlade s kritériami v usmerňovacom dokumente OECD o humánnych parametroch (Guidance Document on Humane Endpoints) (3),

— identifikuje sa cieľový orgán (orgány),

— stanoví sa NOAEL a LOAEL.

LITERATÚRA

1. OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paríž.

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, Paríž.

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, Paríž.

4. Whalan, J. E., a Redden, J. C. (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, D. L., Tyler, W. S., Plopper, C. E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material*, Witschi, H. P., a Brain, J. D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, s. 229 – 258.

6. Young, J. T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309 – 312.

7. Harkema, J. R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231 – 238.

▼**M4**

8. Woutersen, R. A., Garderen-Hoetmer, A., van Slootweg, P. J., Feron, V. J. (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes, M. P., a Ward, J. M. (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, s. 215 – 263.

9. Mery, S., Gross, E. A., Joyner, D. R., Godo, M., Morgan, K. T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353 – 372.

10. Kuper, C. F., Koornstra, P. J., Hameleers, D. M. H., Biewenga, J., Spit, B. J., Duijvestijn, A. M., Breda Vriesman van, P. J. C., Sminia, T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219 –224.

11. Kuper, C. F., Arts, J. H. E., Feron, V. J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140 – 141: 281 – 285.

12. Lewis, D. J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419 – 428.

13. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006 (Ú. v. EÚ L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼**M4**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMU

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M4

B.30. ŠTÚDIE CHRONICKEJ TOXICITY

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov (TG) 452 (2009). Pôvodné usmernenia TG 452 boli prijaté v roku 1981. Vypracovanie tejto revidovanej testovacej metódy B.30 sa považovalo za potrebné na zohľadnenie najnovšieho vývoja v oblasti starostlivosti o zvieratá a regulačných požiadaviek (1) (2) (3) (4). Aktualizácia tejto testovacej metódy B.30 bola vykonaná súbežne s revíziou kapitoly B.32 tejto prílohy, Štúdie karcinogenity, a kapitoly B.33 tejto prílohy, Kombinované štúdie chronickej toxicity/karcinogenity, s cieľom získať ďalšie informácie pomocou zvierat použitých v štúdii a poskytnúť ďalšie podrobné údaje o výbere dávky. Táto testovacia metóda je vypracovaná pre testovanie širokej škály chemikálií vrátane pesticídov a priemyselných chemikálií.

2. Väčšina štúdií chronickej toxicity sa vykonáva na hlodavcoch a táto testovacia metóda sa preto primárne vzťahuje na štúdie vykonávané na týchto živočíšnych druhoch. Ak sa takéto štúdie budú vyžadovať v prípade nehlodavcov, takisto sa s príslušnými úpravami môžu uplatniť princípy a postupy uvedené v tejto testovacej metóde spolu s princípmi a postupmi uvedenými v kapitole B.27 tejto prílohy, 90-dňová štúdia orálnej toxicity pri nehlodavcoch v opakovaných dávkach (5), ako sa uvádza v Usmerňovacom dokumente OECD č. 116 o príprave a vykonávaní štúdií chronickej toxicity a karcinogenity (6).

3. Tri hlavné spôsoby podávania používané v štúdiách chronickej toxicity sú orálne, dermálne a inhalačné podávanie. Výber spôsobu podávania závisí od fyzikálnych a chemických vlastností testovanej chemikálie a najčastejšieho spôsobu expozície u človeka. Ďalšie informácie o výbere spôsobu expozície sú uvedené v usmerňovacom dokumente OECD č. 116 (6).

4. Táto testovacia metóda je zameraná na orálnu expozíciu, ktorá sa v štúdiách chronickej toxicity používa najčastejšie. Hoci dlhodobé štúdie chronickej toxicity využívajúce dermálnu alebo inhalačnú expozíciu môžu byť takisto potrebné na hodnotenie zdravotných rizík pre človeka a/alebo sa môžu vyžadovať v určitých regulačných režimoch, oba spôsoby expozície sú do značnej miery technicky zložité. Takéto štúdie budú musieť byť pripravené v závislosti od jednotlivých prípadov, hoci testovacia metóda, ktorá sa tu uvádza na posúdenie a vyhodnotenie chronickej toxicity pri orálnom podávaní, by mohla slúžiť ako základ protokolu pre inhalačné a/alebo dermálne štúdie vzhľadom na odporúčania týkajúce sa období testovania, klinických a patologických parametrov atď. K dispozícii sú usmernenia OECD o podávaní testovaných chemikálií inhalačným (6) (7) a dermálnym spôsobom (6). Pri príprave dlhodobejších štúdií zahŕňajúcich inhalačnú expozíciu je nutné si preštudovať najmä kapitolu B.8 tejto prílohy (8) a kapitolu B.29 tejto prílohy (9) spolu s Usmerňovacím dokumentom OECD o testovaní akútnej inhalačnej toxicity (7). Kapitolu B.9 tejto prílohy (10) je nutné konzultovať v prípade testovania dermálnej expozície.

▼M4

5. Štúdia chronickej toxicity poskytuje informácie o možnej nebezpečnosti pre zdravie, ktorá sa pravdepodobne vyskytne pri opakovanej expozícii v priebehu významnej časti dĺžky života použitého živočíšneho druhu. Štúdia poskytne informácie o toxických účinkoch testovanej chemikálie, indikuje cieľové orgány a možnosť akumulácie. Môže takisto zabezpečiť odhad hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku, ktorý možno použiť na stanovenie bezpečnostných kritérií týkajúcich sa expozície človeka. Takisto sa v nej zdôrazňuje nutnosť dôkladných klinických pozorovaní zvierat s cieľom získať čo najväčšie množstvo informácií.

6. Medzi ciele štúdie v rámci tejto testovacej metódy patrí:

— identifikácia chronickej toxicity testovanej chemikálie,

— identifikácia cieľových orgánov,

— charakterizácia vzťahu medzi dávkou a reakciou,

— identifikácia hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL) alebo východiska na stanovenie porovnávacej dávky (BMD),

— predpovedanie účinkov chronickej toxicity na úrovniach expozície človeka,

— poskytnutie údajov na testovanie hypotéz týkajúcich sa druhu pôsobenia (6).

ÚVODNÉ ÚVAHY

7. Pri posudzovaní a vyhodnocovaní toxikologických vlastností testovanej chemikálie testovacie laboratórium pred vykonaním štúdie zváži všetky dostupné informácie o testovanej chemikálii s cieľom zamerať prípravu štúdie na účinnejšie testovanie potenciálu chronickej toxicity a minimalizovať využívanie zvierat. Informácie, ktoré pomôžu pri príprave štúdie, zahŕňajú identitu, chemickú štruktúru a fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie, akékoľvek informácie o druhu pôsobenia, výsledky všetkých testov toxicity *in vitro* alebo *in vivo*, predpokladané použitie/použitia a potenciál pre expozíciu ľudí, dostupné údaje (Q)SAR a toxikologické údaje o štrukturálne príbuzných chemikáliách, dostupné toxikokinetické údaje (kinetika pri jednej dávke a takisto pri opakovaných dávkach, ak je k dispozícii) a údaje získané z iných štúdií opakovanej expozície. Stanovenie chronickej toxicity sa vykoná až po získaní prvotných informácií o toxicite z 28-dňového a/alebo 90-dňového testu toxicity v opakovaných dávkach. Stratégiu fázového testovania pri testovaní chronickej toxicity treba zvážiť ako súčasť celkového hodnotenia potenciálnych nepriaznivých zdravotných účinkov danej testovanej chemikálie (11) (12) (13) (14).

8. Štatistické metódy, ktoré sú vzhľadom na prípravu pokusu a ciele na analýzu výsledkov najprimeranejšie, sa stanovia pred začatím štúdie. Je potrebné zvážiť, či by štatistiky nemali zahŕňať úpravu vzhľadom na prežitie zvierat a analýzu v prípade predčasného konca jednej alebo viacerých skupín. Usmernenia o vhodných štatistických analýzach a kľúčové odkazy na medzinárodne uznávané štatistické metódy sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (6), ako aj v Usmerňovacom dokumente č. 35 o analýze a hodnotení štúdií chronickej toxicity a karcinogenity (15).

▼M4

9. Pri vykonávaní štúdie chronickej toxicity je vždy nutné sa riadiť hlavnými zásadami a úvahami uvedenými v Usmerňovacom dokumente OECD č. 19 o rozpoznaní, hodnotení a použití klinických príznakov ako humánnych parametrov pre pokusné zvieratá používané pri hodnotení bezpečnosti (16), najmä v odseku 62. V tomto odseku sa uvádza, že „ak v štúdiách s opakovanými dávkami zviera vykazuje klinické príznaky, ktoré sú progresívne a vedú k ďalšiemu zhoršeniu stavu, je potrebné na základe informácií rozhodnúť, či sa má zviera humánne usmrtiť alebo nie. Pri rozhodovaní treba zvážiť hodnotu informácií, ktoré by sa získali ďalším udržiavaním zvieraťa pri živote v rámci štúdie, v spojitosti s jeho celkovým stavom. Ak sa prijme rozhodnutie, že testovanie zvieraťa bude pokračovať, frekvencia pozorovaní by sa mala podľa potreby zvýšiť. Takisto je možné, bez toho, aby to malo negatívny vplyv na účel testu, dočasne pozastaviť podávanie dávok, ak sa tým zvieraťu uľaví od bolesti alebo utrpenia, alebo znížiť testovaciu dávku.“

10. Podrobné usmernenia a rozbor zásad výberu dávky v štúdiách chronickej toxicity a karcinogenity sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (6), ako aj v dvoch publikáciách Medzinárodného inštitútu prírodných vied (International Life Sciences Institute) (17) (18). Základná stratégia výberu dávky závisí od primárneho cieľa alebo cieľov štúdie (odsek 6). Pri výbere vhodných úrovní dávky je potrebné dosiahnuť rovnováhu medzi skríningom nebezpečnosti na jednej strane a charakterizáciou reakcie na nízke dávky a jej významu na druhej strane. To má význam najmä v prípade kombinovanej štúdie chronickej toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 tejto prílohy, odsek 11).

11. Treba zvážiť vykonanie kombinovanej štúdie chronickej toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 tejto prílohy) namiesto samostatného vykonania štúdie chronickej toxicity (táto testovacia metóda B.30) a štúdie karcinogenity (kapitola B.32 tejto prílohy). Kombinovaným testom sa zabezpečí vyššia účinnosť, pokiaľ ide o čas a náklady, ako v prípade vykonania dvoch samostatných štúdií bez toho, aby sa znížila kvalita údajov, či už vo fáze chronickej toxicity alebo vo fáze karcinogenity. V prípade kombinovanej štúdie chronickej toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 tejto prílohy) však treba náležite zohľadniť zásady výberu dávky (odseky 9 a 20 – 25), pričom sa takisto pripúšťa, že v určitých regulačných rámcoch sa môže vyžadovať vykonanie samostatných štúdií.

12. Vymedzenie pojmov použitých v súvislosti s touto testovacou metódou je uvedené na konci tejto kapitoly a v usmerňovacom dokumente (GD) č. 116 (6).

PRINCÍP TESTU

13. Testovaná chemikália sa podáva denne v odstupňovaných dávkach niekoľkým skupinám pokusných zvierat, zvyčajne počas 12 mesiacov, hoci v závislosti od regulačných požiadaviek možno zvoliť aj dlhšie alebo kratšie obdobia (pozri odsek 33). Vybraté obdobie by malo byť dostatočne dlhé, aby sa mohli prejaviť účinky kumulatívnej toxicity, ale bez toho, aby testovanie zmarili zmeny súvisiace so starnutím zvierat. Odchýlky od 12-mesačného trvania expozície je potrebné odôvodniť, najmä v prípade kratších trvaní. Testovaná chemikália sa zvyčajne podáva orálne, aj keď môže byť vhodné aj testovanie inhalačnej alebo dermálnej expozície. Plán štúdie môže zahŕňať aj jedno alebo viaceré priebežné utratenia, napr. po troch a šiestich mesiacoch, pričom na doplnenie počtu je možné použiť ďalšie skupiny zvierat (pozri odsek 19). Počas tohto obdobia sú na zvieratách dôkladne pozorované prípadné znaky toxicity látok. Pitva sa uskutoční na zvieratách uhynutých alebo usmrtených počas testovania a aj po ukončení testu na zvieratách, ktoré test prežijú.

▼M4

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

14. Táto testovacia metóda primárne zahŕňa posudzovanie a vyhodnocovanie chronickej toxicity pri hlodavcoch (pozri odsek 2), hoci sa pripúšťa, že v určitých regulačných režimoch sa môžu vyžadovať podobné štúdie pri nehlodavcoch. Výber druhu zvierat je potrebné odôvodniť. Príprava a vykonanie štúdií chronickej toxicity pri nehlodavcoch, ak sa požadujú, by mali byť založené na zásadách uvedených v tejto testovacej metóde, ako aj na zásadách uvedených v kapitole B.27 tejto prílohy, 90-dňová štúdia orálnej toxicity pri nehlodavcoch v opakovaných dávkach (5). Ďalšie informácie o výbere druhov a kmeňa zvierat sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (6).

15. V rámci tejto testovacej metódy je najvhodnejším hlodavcom potkan, hoci sa môžu použiť aj iné hlodavce, napr. myši. Potkany a myši sú uprednostňované pokusné modely vzhľadom na ich pomerne krátku dĺžku života, ich rozsiahle využívanie vo farmakologických a toxikologických štúdiách, ich náchylnosť na indukciu nádoru a dostupnosť dostatočne charakterizovaných kmeňov. Vzhľadom na tieto charakteristiky je k dispozícii veľké množstvo informácií o ich fyziológii a patológii. Používajú sa mladé zdravé dospelé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Štúdiu chronickej toxicity možno vykonať pri zvieratách z toho istého kmeňa a zdroja, ako sú zvieratá, ktoré sa použili v predbežnej štúdii (štúdiách) toxicity s kratším trvaním. Používajú sa samice, ktoré nikdy nevrhli mláďatá a sú negravidné.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

16. Zvieratá môžu byť umiestnené jednotlivo alebo v malých skupinách rovnakého pohlavia v klietkach. Samostatné umiestnenie by sa malo zvážiť iba v prípade, že je to vedecky opodstatnené (19) (20) (21). Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy vzhľadom na ich umiestnenie. Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C (± 3 °C). Hoci relatívna vlhkosť by mala byť najmenej 30 % a prednostne by nemala presiahnuť 70 %, okrem času čistenia miestnosti, cieľom by mala byť 50 – 60 % vlhkosť. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Potrava musí vyhovovať všetkým výživovým požiadavkám pre testované druhy zvierat a obsah kontaminantov potravy vrátane rezíduí pesticídov, perzistentných organických znečisťujúcich látok, fytoestrogénov, ťažkých kovov, mykotoxínov a iných kontaminantov, ktoré môžu mať vplyv na výsledky testu, musí byť čo najnižší. Analytické informácie o úrovni živín a kontaminantov potravy by sa mali získavať priebežne, aspoň na začiatku štúdie a pri zmene používanej šarže, a mali by sa uviesť v záverečnej správe. Podobne treba uviesť analytické informácie o pitnej vode použitej v štúdii. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej chemikálie a potrebou splniť výživové požiadavky pri zvieratách v prípade, že sa testovaná chemikália podáva v potrave.

Príprava zvierat

17. Použijú sa zdravé zvieratá, ktoré sa aklimatizovali na laboratórne podmienky aspoň sedem dní a ktoré sa predtým nepodrobili iným pokusom. V prípade hlodavcov sa musí dávkovanie začať čo najskôr po odstavení mláďat a aklimatizácii a podľa možnosti skôr, než zvieratá dovŕšia vek ôsmich týždňov. Pokusné zvieratá sa charakterizujú na základe druhu, kmeňa, zdroja, pohlavia, hmotnosti a veku. Na začiatku štúdie má byť rozdiel medzi hmotnosťami použitých zvierat z každého pohlavia minimálny a pre každé pohlavie zvlášť nemá presahovať ± 20 % priemernej

▼M4

hmotnosti všetkých zvierat v štúdii. Zvieratá by mali byť postupne zadelené do kontrolných skupín a skupín, ktorým sa podáva látka. Po randomizácii by medzi jednotlivými skupinami v rámci každého pohlavia nemali byť výrazné rozdiely v priemernej telesnej hmotnosti. Ak existujú štatisticky významné rozdiely, randomizácia by sa podľa možnosti mala zopakovať. Každému zvieraťu sa pridelí jedinečné identifikačné číslo, ktorým sa zviera trvalo označí tetovaním, mikročipovým implantátom alebo inou vhodnou metódou.

POSTUP

Počet zvierat a ich pohlavie

18. Použijú sa obe pohlavia. Mal by sa použiť dostatočný počet zvierat, aby bol na konci štúdie v každej skupine k dispozícii dostatok zvierat na dôkladné biologické a štatistické hodnotenie. V prípade hlodavcov sa zvyčajne použije minimálne 20 zvierat z každého pohlavia na skupinu pri každej úrovni dávky, zatiaľ čo pri nehlodavcoch sa odporúča použitie minimálne štyroch zvierat z každého pohlavia na skupinu. V štúdiách, v ktorých sa využívajú myši, môže byť na uskutočnenie všetkých požadovaných hematologických vyšetrení potrebné použiť v každej skupine s dávkou viac zvierat.

Zabezpečenie priebežného utrácania, satelitných skupín a sentinelových zvierat

19. Ak je to vedecky opodstatnené, v štúdii sa môže počítať s priebežným utrácaním (najmenej desať zvierat z každého pohlavia na skupinu), napr. po šiestich mesiacoch, s cieľom získať informácie o progresii toxikologických zmien a mechanistické informácie. Ak už takéto informácie o testovanej chemikálii sú k dispozícii z predchádzajúcich štúdií toxicity v opakovaných dávkach, priebežné utrácanie zvierat nie je vedecky opodstatnené. Takisto je možné použiť satelitné skupiny na monitorovanie reverzibility akýchkoľvek toxikologických zmien vyvolaných skúmanou testovanou chemikáliou. Tieto skupiny sa zvyčajne obmedzujú na najvyššiu úroveň dávky použitej v štúdii a na kontrolu. Na monitorovanie stavu choroby možno počas štúdie v prípade potreby použiť aj ďalšiu skupinu sentinelových zvierat (zvyčajne päť zvierat z každého pohlavia) (22). Ak sa plánuje priebežné utrácanie zvierat alebo použitie satelitných alebo sentinelových skupín, počet zvierat zahrnutých v pláne štúdie by mal byť zvýšený o plánovaný počet zvierat, ktoré majú byť utratené pred ukončením štúdie. Tieto zvieratá sa zvyčajne podrobia tým istým pozorovaniam vrátane pozorovaní telesnej hmotnosti, spotreby potravy/vody, hematologickým meraniam a meraniam klinickej biochémie a patologickým vyšetreniam ako zvieratá vo fáze chronickej toxicity v rámci základnej štúdie, hoci sa takisto môže zabezpečiť, aby sa (v skupinách, v ktorých sa plánuje priebežné utrácanie zvierat) merania obmedzili na špecifické kľúčové ukazovatele, ako je neurotoxicita alebo imunotoxicita.

Skupiny s dávkami a dávkovanie

20. Usmernenia o všetkých aspektoch výberu dávky a odstupoch medzi jednotlivými úrovňami dávok sú uvedené v usmerňovacom dokumente č.116 (6). Použijú sa aspoň tri úrovne dávky a súbežná kontrola s výnimkou prípadov, keď sa vykonáva limitný test (pozri odsek 27). Úroveň dávky zvyčajne vychádza z výsledkov krátkodobých štúdií v opakovaných dávkach alebo štúdií na zistenie rozsahu, pričom je potrebné prihliadať na existujúce toxikologické a toxikokinetické údaje, ktoré sú o testovanej chemikálii alebo príbuzných chemikáliách k dispozícii.

▼M4

21. Pokiaľ to dovoľuje fyzikálno-chemický charakter alebo biologické účinky testovanej chemikálie, na identifikáciu hlavných cieľových orgánov a toxických účinkov by sa mala vybrať najvyššia úroveň dávky, ktorá súčasne nebude mať za následok utrpenie, závažnú toxicitu, morbiditu alebo uhynutie. Pri súčasnom zohľadnení faktorov uvedených v odseku 22 by sa mala vybrať najvyššia úroveň dávky preukazujúca toxicitu, o ktorej svedčí napríklad pokles prírastku telesnej hmotnosti (o približne 10 %).

22. V závislosti od cieľov štúdie (pozri odsek 6) však možno vybrať najvyššiu dávku, ktorá je nižšia ako dávka preukazujúca toxicitu, napr. ak dávka vyvoláva daný nepriaznivý účinok, ktorý má však malý vplyv na dĺžku života alebo na telesnú hmotnosť. Najvyššia dávka by nemala presiahnuť 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň (limitná dávka, pozri odsek 27).

23. Úrovne dávok a odstupy medzi úrovňami dávok možno vybrať s cieľom určiť vzťah medzi dávkou a reakciou a hladinu NOAEL alebo iný plánovaný výsledok štúdie, napr. BMD (pozri odsek 25) pri najnižšej úrovni dávky. Medzi faktory, ktoré by sa mali zvážiť pri podávaní nižších dávok, patrí predpokladaný sklon krivky závislosti reakcie od dávky, dávky, pri ktorých môže dochádzať k významným zmenám v metabolizme, alebo druhu toxického pôsobenia, keď sa očakáva prahová hodnota alebo keď sa očakáva východisko pre extrapoláciu nízkej dávky.

24. Vybraté odstupy medzi úrovňami dávok budú závisieť od vlastností testovanej chemikálie a nemožno ich v rámci tejto testovacej metódy predpísať, ale dobrá účinnosť testov sa často dosahuje, ak sa na stanovenie zostupného dávkovania použijú intervaly dávkovania s faktorom dva až štyri, pričom pridanie štvrtej pokusnej skupiny je často vhodnejšie ako používanie veľmi veľkých intervalov (napr. s faktorom vyšším ako 6 – 10) medzi dávkami. Vo všeobecnosti by sa nemali používať faktory vyššie ako 10 a v prípade, že sa použijú, je nutné tento postup odôvodniť.

25. Ako sa ďalej uvádza v usmerňovacom dokumente č.116 (6), pri výbere dávky je potrebné zvážiť tieto body:

— známe alebo predpokladné nelinearity alebo inflexné body krivky závislosti reakcie od dávky,

— toxikokinetika a rozsahy dávok, pri ktorých dochádza alebo nedochádza k metabolickej indukcii, nasýteniu alebo nelinearite medzi externými a internými dávkami,

— prekurzorné poškodenia, markery účinkov alebo ukazovatele prebiehajúcich kľúčových základných biologických procesov,

— kľúčové (alebo predpokladané) aspekty druhu pôsobenia, ako sú dávky, pri ktorých začína vznikať cytotoxicita, narúšajú sa hormonálne hladiny, preťažujú sa homeostatické mechanizmy atď.,

— oblasti krivky závislosti reakcie od dávky, kde je potrebný veľmi podrobný odhad, napr. v oblasti predpokladanej dávky BMD alebo predpokladanej prahovej úrovne,

— zváženie očakávaných úrovní expozície človeka.

▼M4

26. Kontrolnou skupinou je skupina, ktorá nebola vystavená účinkom chemikálie, alebo skupina, ktorej sa podáva nosič, ak sa pri podávaní testovanej chemikálie používa nosič. So zvieratami v kontrolnej skupine sa musí zaobchádzať takisto ako so zvieratami v testovaných skupinách, s výnimkou aplikovania testovanej chemikálie. Ak sa použije nosič, kontrolná skupina dostane nosič v najvyššom objeme, aký bol použitý pri skupinách s dávkami. Ak sa testovaná chemikália podáva v potrave a vedie k výraznému zníženiu príjmu potravy v dôsledku zvýšeného nechutenstva, môže byť užitočné použiť ďalšiu súčasne kŕmenú kontrolnú skupinu, ktorá poslúži ako vhodnejšia kontrola.

27. Ak na základe informácií z predbežných štúdií možno predpokladať, že test pri jednej úrovni dávky dosahujúcej najmenej 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň s využitím postupov opísaných pre túto štúdiu pravdepodobne nebude mať nepriaznivé účinky a ak sa na základe údajov o štrukturálne príbuzných chemikáliách neočakáva toxicita, potom sa úplná štúdia s využitím troch úrovní dávok nepovažuje za potrebnú. Uplatňuje sa limit 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň s výnimkou prípadu, keď expozícia človeka indikuje potrebu použitia vyššej úrovne dávky.

Príprava dávok a podávanie testovanej chemikálie

28. Testovaná chemikália sa zvyčajne podáva orálne, v potrave alebo pitnej vode alebo cez sondu. Ďalšie informácie o spôsoboch a metódach podávania sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (6). Spôsob a metóda podávania závisí od účelu štúdie, fyzikálnych/chemických vlastností testovanej chemikálie, jej biodostupnosti a prevládajúceho spôsobu a metódy expozície u človeka. Vybratý spôsob a metódu podávania je potrebné odôvodniť. V záujme zabezpečenia dobrých životných podmienok pre zvieratá sa orálna sonda zvyčajne zvolí iba v prípade látok, pri ktorých spôsob a metóda podávania primerane reprezentuje potenciálnu expozíciu u človeka (napr. v prípade liekov). Potravinové alebo environmentálne chemikálie obsahujúce pesticídy sa zvyčajne podávajú v potrave alebo v pitnej vode. V určitých prípadoch, napr. v prípade expozície na pracovisku, však môže byť vhodnejšie podanie iným spôsobom.

29. Ak je to potrebné, testovaná chemikália sa rozpustí alebo suspenduje vo vhodnom nosiči. Náležitá pozornosť by sa mala venovať nasledujúcim vlastnostiam nosiča a ostatným aditívam: vplyv na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo zadržiavanie testovanej chemikálie, vplyvy na chemické vlastnosti testovanej chemikálie, ktoré môžu zmeniť svoje toxické vlastnosti, vplyv na spotrebu potravy a vody alebo na stav výživy zvierat. Odporúča sa, aby sa vždy, keď je to možné, najskôr zvážilo použitie vodného roztoku/suspenzie, potom roztoku/emulzie v oleji (napr. kukuričný olej) a nakoniec prípadného roztoku v iných nosičoch. Charakteristiky toxicity nosičov iných ako voda musia byť známe. Musia byť k dispozícii informácie o stabilite testovanej chemikálie a homogenite dávkovacích roztokov alebo krmív (podľa potreby) v podmienkach podávania (napr. v potrave).

30. V prípade chemikálií podávaných v potrave alebo pitnej vode je dôležité zabezpečiť, aby množstvá použitej testovanej chemikálie neinterferovali s normálnou výživovou a vodnou bilanciou. V dlhodobých štúdiách toxicity, pri ktorých sa využíva podávanie v potrave, by koncentrácia testovanej chemikálie v krmive zvyčajne nemala presiahnuť horný limit 5 % z celkového množstva krmiva, aby sa zabránilo nutričnej nevyváženosti. Ak je testovaná chemikália podávaná v potrave, môže sa použiť buď konštantná stravná koncentrácia (mg/kg potravy alebo ppm) alebo konštantná úroveň dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa (mg/kg telesnej hmotnosti), ktorá sa vypočíta každý týždeň. Použitú alternatívu je potrebné špecifikovať.

▼M4

31. V prípade orálneho podávania sa zvieratám podávajú dávky testovanej chemikálie denne (sedem dní v týždni), zvyčajne počas 12 mesiacov (pozri aj odsek 33), hoci v závislosti od regulačných požiadaviek sa môže požadovať dlhšie obdobie. Použitie každého iného režimu dávkovania, napr. päť dní v týždni, sa musí odôvodniť. V prípade podávania cez kožu sa zvieratám zvyčajne aplikuje testovaná chemikália najmenej šesť hodín denne, sedem dní v týždni, ako je uvedené v kapitole B.9 tejto prílohy (10), počas 12 mesiacov. Inhalačná expozícia sa vykonáva šesť hodín denne, sedem dní v týždni, ale ak je to odôvodnené, môže sa použiť aj expozícia počas piatich dní v týždni. Obdobie expozície zvyčajne trvá 12 mesiacov. Ak sa v prípade iných hlodavcov ako potkanov použije expozícia oblasti nosa, maximálne trvanie expozície je možné prispôsobiť s cieľom minimalizovať druhovo špecifické utrpenie. Ak sa použije expozícia v trvaní menej ako šesť hodín denne, treba uviesť odôvodnenie. Pozri aj kapitolu B.8 tejto prílohy (8).

32. Ak sa testovaná chemikália zvieratám podáva pomocou sondy, podáva sa prostredníctvom žalúdočnej sondy alebo vhodnej intubačnej kanyly približne v rovnakom čase každý deň. Zvyčajne sa podáva jedna dávka raz za deň. Ak je napríklad chemikália lokálne dráždivá, je možné zachovať dennú dávku tak, že sa rozdelí a podá v dvoch častiach (dvakrát denne). Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Objem by mal byť podľa možnosti čo najnižší a v prípade hlodavcov by zvyčajne nemal presahovať 1 ml/100 g telesnej hmotnosti (22). Zmeny v aplikovanom objeme sa minimalizujú tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem vo všetkých dávkach. Výnimkou sú potenciálne žieravé alebo dráždivé chemikálie, ktoré je nutné zriediť, aby sa predišlo závažným lokálnym účinkom. Nemalo by sa testovať pri koncentráciách, ktoré sú pravdepodobne žieravé alebo dráždivé pre gastrointestinálny trakt.

Trvanie štúdie

33. Hoci táto testovacia metóda je primárne navrhnutá ako 12-mesačná štúdia chronickej toxicity, plán štúdie možno použiť aj pri štúdiách s kratším (napr. šesť alebo deväť mesiacov) alebo dlhším trvaním (napr. 18 alebo 24 mesiacov) v závislosti od požiadaviek konkrétnych regulačných režimov alebo špecifických mechanistických účelov. Odchýlky od 12-mesačného trvania expozície je potrebné odôvodniť, najmä v prípade kratších trvaní. Satelitné skupiny zahrnuté s cieľom monitorovať reverzibilitu všetkých toxikologických zmien spôsobených skúmanou testovanou chemikáliou by sa mali zachovať bez dávkovania najmenej počas štyroch týždňov a najviac počas jednej tretiny celkového trvania štúdie po ukončení expozície. Ďalšie usmernenia vrátane úvah o prežití v štúdii sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (6).

POZOROVANIA

34. Pri všetkých zvieratách si treba všímať morbiditu alebo mortalitu, zvyčajne na začiatku a na konci každého dňa vrátane víkendov a sviatkov. Všeobecné klinické pozorovania sa vykonávajú najmenej raz denne, najlepšie každý deň v rovnakom čase, vzhľadom na časový vrchol očakávaných účinkov po dávkovaní v prípade podávania cez sondu.

▼M4

35. Všetky zvieratá sa pred prvou expozíciou najmenej raz podrobia dôkladným klinickým pozorovaniam (aby sa umožnilo porovnávanie jednotlivých zvierat navzájom), potom na konci prvého týždňa štúdie a následne každý mesiac. Protokol o pozorovaniach musí byť pripravený tak, aby sa rozdiely medzi jednotlivými pozorovateľmi minimalizovali a neboli závislé od testovacej skupiny. Tieto pozorovania sa vykonávajú mimo domovskej klietky, radšej v štandardnej aréne a v podobnom čase pri každej príležitosti. Musia byť pozorne zaznamenané, s použitím hodnotiaceho systému explicitne vymedzeného testovacím laboratóriom. Je potrebné minimalizovať odlišnosti v podmienkach pozorovaní. Medzi príznaky, ktoré je potrebné si všímať, patria zmeny na koži, srsti, očiach, sliznici, výskyt sekrécie, exkrécie a vegetatívnej aktivity (slzenie, piloerekcia, veľkosť zreničiek a nezvyčajné dýchanie), ale uvedené príznaky nie sú vyčerpávajúce. Zmeny v chôdzi, držaní tela a reakcii na zaobchádzanie, ako aj prítomnosť kónických alebo napätých pohybov, stereotypov (napr. nadmerné očisťovanie tela, opakované točenie sa) alebo zvláštne správanie (napr. chôdza dozadu, sebaznetvorenie) sa takisto musia zaznamenať (24).

36. Pred prvým podaním testovanej chemikálie sa pri všetkých zvieratách vykoná oftalmologické vyšetrenie pomocou oftalmoskopu alebo iného vhodného zariadenia. Na konci štúdie sa toto vyšetrenie podľa možnosti vykoná pri všetkých zvieratách, ale minimálne pri zvieratách v skupine s vysokou dávkou a zvieratách v kontrolnej skupine. Ak sa po vystavení zvierat účinkom látky zistia zmeny na očiach, musia byť vyšetrené všetky zvieratá. Ak štrukturálna analýza alebo iné informácie indikujú toxicitu očí, potom je potrebné zvýšiť frekvenciu očných vyšetrení.

37. V prípade chemikálií, pri ktorých predchádzajúce 28-dňové a/alebo 90-dňové testy toxicity v opakovaných dávkach indikovali potenciál vyvolať neurotoxické účinky, sa môže nepovinne vykonať určenie zmyslovej reaktivity podnecovanej rôznymi spôsobmi (24) (napr. zvukovými, zrakovými a proprioceptívnymi podnetmi) (25) (26) (27), hodnotenie sily zovretia (28) a hodnotenie motorickej aktivity (29), a to pred začiatkom štúdie a každé tri mesiace po začatí štúdie počas až 12 mesiacov, ako aj pri ukončení štúdie (ak štúdia trvá dlhšie ako 12 mesiacov). Ďalšie podrobnosti o postupoch, ktoré môžu nasledovať, sú uvedené v príslušných odkazoch. Možno však použiť aj iné alternatívne postupy k postupom, ktoré tu boli opísané.

38. V prípade chemikálií, pri ktorých predchádzajúce 28-dňové a/alebo 90-dňové testy toxicity v opakovaných dávkach indikovali potenciál vyvolať imunotoxické účinky, možno nepovinne na konci testu vykonať ďalšie vyšetrenia tohto parametra.

Telesná hmotnosť, spotreba potravy/vody a účinnosť krmiva

39. Všetky zvieratá sa odvážia na začiatku testu, najmenej raz týždenne počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Spotreba potravy a účinnosť krmiva sa merajú najmenej raz za týždeň počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Ak sa chemikália podáva vo vode na pitie, spotreba vody sa meria najmenej raz za týždeň počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Merania spotreby vody by sa mali zvážiť aj v prípade štúdií, pri ktorých sa mení pitný režim.

▼M4

Hematológia a klinická biochémia

40. V štúdiách využívajúcich hlodavce sa hematologické vyšetrenia vykonajú najmenej pri desiatich samcoch a desiatich samiciach v každej skupine, a to po 3, 6 a 12 mesiacoch, a takisto na konci štúdie (ak štúdia trvá dlhšie ako 12 mesiacov), pričom sa vždy použijú tie isté zvieratá. V prípade myší môžu byť na uskutočnenie všetkých požadovaných hematologických vyšetrení potrebné satelitné zvieratá (pozri odsek 18). V prípade štúdií nehlodavcov sa vzorky odoberú menšiemu počtu zvierat (napr. v prípade štúdií psov štyrom zvieratám z každého pohlavia v každej skupine), a to v priebežných časoch na odber vzoriek a na konci štúdie, podobne ako sa uvádza pri štúdiách hlodavcov. Pri hlodavcoch ani nehlodavcoch nie je nutné vykonať merania po troch mesiacoch, ak v predchádzajúcej 90-dňovej štúdii vykonanej pri porovnateľných úrovniach dávok nebol na hematologických parametroch pozorovaný žiadny účinok. Vzorky krvi sa odoberajú v anestézii zo stanoveného miesta, napríklad vpichom do srdca alebo zo zadnej očnicovej dutiny.

41. Je potrebné vyšetriť tieto parametre (30): celkový a diferenciálny počet leukocytov, počet erytrocytov, počet trombocytov, koncentrácia hemoglobínu, hematokrit, stredný objem erytrocytu (MCV), stredná koncentrácia hemoglobínu v erytrocyte (MCH), stredná farebná koncentrácia hemoglobínu (MCHC), protrombínový čas a aktivovaný parciálny tromboplastínový čas. Podľa potreby sa v závislosti od toxicity testovanej chemikálie môžu merať ďalšie hematologické parametre, ako sú Heinzove telieska alebo iná atypická morfológia erytrocytov alebo methemoglobín. Vo všeobecnosti treba zaujať flexibilný postoj v závislosti od pozorovaného a/alebo očakávaného účinku danej testovanej chemikálie. Ak má testovaná chemikália vplyv na hematopoetický systém, môže byť indikovaný aj počet retikulocytov a cytológia kostnej drene, hoci tieto vyšetrenia sa bežne nemusia vykonávať.

42. Klinická biochémia skúma hlavné toxické účinky na tkanivá a najmä účinky na obličky a pečeň. Vyšetrenie sa uskutočňuje zo vzoriek krvi, ktoré sa odoberú aspoň desiatim samcom a desiatim samiciam z každej skupiny v tých istých časových intervaloch, ako je špecifikované pre hematologické vyšetrenia, pričom sa vždy použijú tie isté zvieratá. V prípade myší môžu byť na uskutočnenie všetkých požadovaných vyšetrení klinickej biochémie potrebné satelitné zvieratá. V prípade štúdií nehlodavcov sa vzorky odoberú menšiemu počtu zvierat (napr. v prípade štúdií psov štyrom zvieratám z každého pohlavia v každej skupine), a to v priebežných časoch na odber vzoriek a na konci štúdie, podobne ako sa uvádza pri štúdiách hlodavcov. Pri hlodavcoch ani nehlodavcov nie je nutné vykonať merania po troch mesiacoch, ak v predchádzajúcej 90-dňovej štúdii vykonanej pri porovnateľných úrovniach dávok nebol na parametroch klinickej biochémie pozorovaný žiadny účinok. Odporúča sa, aby sa zvieratá (s výnimkou myší) noc pred odobratím vzoriek krvi nekŕmili. Je potrebné vyšetriť tieto parametre (30): glukóza, močovina (močovinový dusík), kreatinín, celkový obsah bielkovín, albumín, vápnik, sodík, draslík, celkový cholesterol, najmenej dva vhodné testy na hepatocelulárne hodnotenie (alanín-aminotransferáza, aspartát-aminotransferáza, glutamát-dehydrogenáza, celkový obsah žlčových kyselín) (31) a najmenej dva vhodné testy na hepatobiliárne hodnotenie (alkalín-fosfatáza, gama-glutamyl-transferáza, 5-nukleotidáza, celkový bilirubín, celkový obsah žlčových kyselín) (31). Podľa potreby sa v závislosti od toxicity testovanej chemikálie môžu merať ďalšie parametre klinickej chémie, ako je hladina triglyceridov nalačno, špecifické hormóny a cholínesteráza. Vo všeobecnosti treba zaujať flexibilný postoj v závislosti od pozorovaného a/alebo očakávaného účinku danej testovanej chemikálie.

▼M4

43. Rozbor moču sa vykonáva najmenej pri desiatich samcoch a desiatich samiciach v každej skupine zo vzoriek odobratých v rovnakých intervaloch ako v prípade hematológie a klinickej chémie. Nie je nutné vykonať merania po troch mesiacoch, ak v predchádzajúcej 90-dňovej štúdii vykonanej pri porovnateľných úrovniach dávok nebol v rozbore moču pozorovaný žiadny účinok. Do odborného odporúčania pre štúdie klinickej patológie bol zahrnutý tento zoznam parametrov (30): vzhľad, objem, osmolalita alebo špecifická váha, pH, celkový obsah bielkovín a glukóza. Medzi ostatné parametre patria ketón, urobilinogén, bilirubín a okultné krvácanie. Ďalšie parametre sa môžu použiť, ak je potrebné rozšíriť vyšetrovanie pozorovaných účinkov.

44. Vo všeobecnosti je potrebné určiť základné hematologické ukazovatele a ukazovatele klinickej biochémie pred začatím testovania v štúdiách psov, ale nemusia sa určiť v štúdiách hlodavcov (30). Ak však historické základné údaje (pozri odsek 50) nie sú vhodné, treba uvažovať o získaní týchto údajov.

Patológia

Makroskopická pitva

45. Všetky zvieratá v štúdii sa zvyčajne podrobujú kompletnej podrobnej makroskopickej pitve, ktorá zahŕňa dôkladné skúmanie vonkajšieho povrchu tela, všetkých telesných otvorov a lebečnej, hrudnej a brušnej dutiny a ich obsahu. Môžu sa však takisto zabezpečiť (v prípade priebežného utrácania alebo satelitných skupín), aby sa merania obmedzovali na špecifické kľúčové ukazovatele, ako je neurotoxicita alebo imunotoxicita (pozri odsek 19). Tieto zvieratá sa nemusia podrobiť pitve ani ďalším postupom opísaným v nasledujúcich odsekoch. Pri sentinelových zvieratách môže byť v závislosti od konkrétneho prípadu potrebná pitva, o ktorej rozhodne vedúci štúdie.

46. Orgánové hmotnosti by sa mali zistiť pri všetkých zvieratách, s výnimkou tých, ktoré sú vylúčené podľa ďalšej časti odseku 45. Nadobličky, mozog, nadsemenníky, srdce, obličky, pečeň, vaječníky, slezina, semenníky, štítna žľaza (vážená po fixácii, s prištítnymi telieskami) a maternica zo všetkých zvierat (okrem tých, pri ktorých sa zistilo chradnutie alebo ktoré sa priebežne utratili) by sa mali upraviť na priľnavej tkanine a je potrebné čo najrýchlejšie po disekcii zistiť ich mokrú hmotnosť, aby sa zabránilo vyschnutiu. V štúdii myší nie je povinné vážiť nadobličky.

47. Tieto tkanivá by sa mali uchovávať v čo najvhodnejšom fixačnom médiu na obidva typy tkanív a na neskoršie histopatologické vyšetrenie (32) (vyšetrenia tkanív v hranatých zátvorkách sú nepovinné):

Všetky makroskopické poškodenia	srdce	pankreas	žalúdok (predný žalúdok, žľaznatý žalúdok)
nadoblička	ileum	prištítne teliesko	[zuby]
aorta	lačník	periférny nerv	semenníky
mozog (vrátane častí predného mozgu, mozočka a predĺženej miechy/mosta)	oblička	hypofýza	týmus
slepé črevo	slzná žľaza (extraorbitálna)	prostata	štítna žľaza
krčok maternice	pečeň	rektum	[jazyk]

▼**M4**

koagulačná žľaza	pľúca	slinná žľaza	priedušnica
hrubé črevo	lymfatické uzliny (povrchové aj hlboké)	semenný mechúrik	močový mechúr
dvanástnik	prsná žľaza (povinné pri samiciach, a ak je zrejmé, že možno urobiť disekciu, aj pri samcoch)	kostrové svaly	maternica (vrátane krčka maternice)
nadsemenníky	[horný dýchací trakt vrátane nosa, nosových mušlí a prínosových dutín]	koža	[močovod]
oko (vrátane sietnice)	pažerák	miecha (na troch úrovniach: krčnej, hrudnej a lumbálnej)	[močová rúra]
[stehnová kosť s kĺbom]	[čuchový bulbus]	slezina	vagína
žlčník (v prípade iných druhov zvierat ako potkany)	vaječníky	[hrudná kosť]	prierez kostnej drene a/alebo čerstvý aspirát kostnej drene
Harderova žľaza			

V prípade párových orgánov, ako sú napríklad obličky a nadobličky, sa zachovajú obidva orgány. Z klinických a iných nálezov môže vyplynúť potreba vyšetrenia ďalších tkanív. Takisto by sa mali zachovať všetky orgány, ktoré vzhľadom na známe vlastnosti testovanej chemikálie možno považovať za cieľové orgány. V štúdiách, v ktorých sa chemikália podáva dermálne, je zoznam orgánov rovnaký ako v prípade orálneho podávania, pričom je nevyhnutný špecifický odber vzorky a zachovanie kože z miesta aplikácie chemikálie. V inhalačných štúdiách sa zoznam zachovaných a skúmaných tkanív dýchacieho traktu zostaví na základe odporúčaní kapitoly B.8 tejto prílohy (8) a kapitoly B.29 tejto prílohy (9). Pokiaľ ide o orgány/tkanivá (a popri špecificky uchovávaných tkanivách dýchacieho traktu), je potrebné vyšetriť tie isté orgány ako v prípade orálnej expozície.

Histopatológia

48. K dispozícii sú usmernenia o najlepších postupoch na vykonávanie štúdií toxikologickej patológie (32). Histopatologickým vyšetreniam sa podrobia minimálne:

— všetky tkanivá zo skupín s vysokou dávkou a kontrolných skupín,

— všetky tkanivá zo zvierat, ktoré uhynuli alebo boli utratené v priebehu štúdie,

— všetky tkanivá vykazujúce makroskopické abnormality,

— cieľové tkanivá alebo tkanivá, ktoré v skupinách s vysokou dávkou vykazujú zmeny spôsobené aplikáciou chemikálie, zo všetkých zvierat zo všetkých skupín s odlišným dávkovaním,

— v prípade párových orgánov, ako sú napríklad obličky alebo nadobličky, sa vyšetria obidva orgány.

▼M4

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

49. Pri všetkých hodnotených parametroch sa uvedú údaje o jednotlivých zvieratách. Navyše všetky údaje sa musia zhrnúť v tabuľkovej forme, pričom ukazujú pre každú testovanú skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat uhynutých počas testu alebo usmrtených z humánnych dôvodov, čas uhynutia alebo humánneho usmrtenia jednotlivých zvierat, počet zvierat, pri ktorých sa prejavili známky toxicity, opis pozorovaných známok toxicity vrátane nástupu, času a prudkosti toxických účinkov, počet zvierat vykazujúcich poškodenie, typy poškodení a percentuálne množstvo zvierat, pri ktorých sa prejavil daný typ poškodenia. Zhrnuté údaje v tabuľkách musia okrem stupňa poškodení udávať priemer a smerodajnú odchýlku (v prípade priebežných údajov o teste) pri zvieratách vykazujúcich toxické účinky alebo poškodenia.

50. Pri interpretácii výsledkov štúdie môžu byť užitočné historické kontrolné údaje, napr. v prípade, ak existujú indikácie, že údaje získané v rámci súbežných kontrol sa výrazne odlišujú v porovnaní s novými údajmi pri kontrolných zvieratách z rovnakého testovacieho zariadenia/kolónie. V prípade hodnotenia historických kontrolných údajov by ich malo predložiť to isté laboratórium a mali by sa vzťahovať na zvieratá rovnakého veku a z toho istého kmeňa vytvoreného v priebehu piatich rokov, ktoré danej štúdii predchádzali.

51. Ak je to možné, numerické výsledky budú spracované vhodnou a všeobecne uplatniteľnou štatistickou metódou. Štatistické metódy a údaje, ktoré budú analyzované, sa vyberú počas plánovania štúdie (odsek 8). Výber musí v prípade potreby počítať s úpravami vzhľadom na prežitie.

Správa o teste

52. Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter, čistota a fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje,

— zdroj chemikálie,

— číslo šarže,

— certifikát chemickej analýzy.

Nosič (v prípade potreby):

— odôvodnenie výberu nosiča (ak je iný ako voda).

Testovacie zvieratá:

— použitý druh/kmeň a odôvodnenie výberu,

— počet, vek a pohlavie zvierat na začiatku testu,

▼M4

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.,

— hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku testu.

Podmienky testovania:

— odôvodnenie spôsobu podávania a výberu dávky,

— ak je to použiteľné, štatistické metódy použité na analýzu údajov,

— údaje o príprave testovanej chemikálie/krmiva,

— analytické údaje o dosiahnutej koncentrácii, stabilite a homogenite prípravku,

— spôsob podávania a údaje o podávaní testovanej chemikálie,

— v prípade inhalačných štúdií, či ide o expozíciu oblasti nosa alebo expozíciu celého tela,

— skutočné dávky (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), faktor konverzie z potravy/pitnej vody, koncentrácia testovanej chemikálie (mg/kg alebo ppm), ak je to použiteľné,

— podrobné informácie o kvalite potravy a vody.

Výsledky (predloží sa tabuľkové zhrnutie údajov a údaje o jednotlivých zvieratách):

— údaje o prežití,

— telesná hmotnosť a zmeny telesnej hmotnosti,

— spotreba potravy, výpočty účinnosti krmiva, pokiaľ sa vykonali, a spotreba vody, ak je to použiteľné,

— údaje o toxikologickej reakcii podľa pohlavia a úrovne dávky vrátane príznakov toxicity,

— povaha, rozsah (a ak sa hodnotí, závažnosť) a trvanie klinických pozorovaní (či už prechodných alebo stálych),

— oftalmologické vyšetrenia,

— hematologické testy,

— testy klinickej biochémie,

— testy rozboru moču,

— výsledky všetkých vyšetrení neurotoxicity alebo imunotoxicity,

— konečná telesná hmotnosť,

— orgánové hmotnosti (a ich pomery, ak je to použiteľné),

— pitevné nálezy,

— podrobný opis všetkých histopatologických nálezov súvisiacich s aplikáciou chemikálie,

— absorpčné údaje, ak sú dostupné.

▼M4

Štatistické spracovanie výsledkov v prípade potreby

Rozbor výsledkov zahŕňajúci:

— vzťah medzi dávkou a reakciou,

— zváženie všetkých informácií o druhu pôsobenia,

— rozbor všetkých prístupov modelovania,

— stanovenie BMD, NOAEL alebo LOAEL,

— historické kontrolné údaje,

— význam pre človeka.

Závery

LITERATÚRA

1. OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rím, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paríž.

2. Combes, R. D., 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, S. M., Greig, J. B., Bridges, J. W. a kol. (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145 – 191.

4. Chhabra, R. S., Bucher, J. R., 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. Kapitola B.27 tejto prílohy, Test subchronickej orálnej toxicity: opakovaná 90-dňová štúdia orálnej toxicity u nehlodavcov.

6. OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – druhé vydanie. Series on Testing and Assessment No. 116, dostupné na verejnej webovej stránke OECD s usmerneniami na vykonávanie testov na adrese www.oecd.org/env/testguidelines.

7. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paríž.

8. Kapitola B.8 tejto prílohy, Subakútna inhalačná toxicita: 28-dňová štúdia.

9. Kapitola B.29 tejto prílohy, Subchronická inhalačná toxicita: 90-dňová štúdia

10. Kapitola B.9 tejto prílohy, Toxicita po 28–dňovej opakovanej dávke (dermálna).

11. Carmichael, N. G., Barton, H. A., Boobis, A. R. a kol. (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1 – 7.

12. Barton, H. A., Pastoor, T. P., Baetcke, T. a kol. (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, J. E., Boobis, A. R., Blacker, A. a kol. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37 – 68.

▼M4

14. Cooper, R. L., Lamb, J. S., Barlow, S. M. a kol. (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, Paríž.

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, Paríž.

17. Rhomberg, L. R., 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, J. A. (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

19. Smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2012 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely (Ú. v. EÚ L 276, 20.10.2010, s. 33).

20. National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

21. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

22. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

23. Diehl, K.-H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.-M., van de Vorstenbosch, C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21: 15 – 23.

24. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

25. Tupper, D. E., Wallace, R. B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999 – 1003.

26. Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691 – 704.

27. Moser, V. C., McDaniel, 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: 267 – 283.

28. Meyer, O. A., Tilson, H. A., Byrd, W. C., Riley, M. T. (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233 – 236.

29. 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.

▼**M4**

30. Weingand, K., Brown, G., Hall R. a kol. (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**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMU

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼B

B.31. **ŠTÚDIA PRENATÁLNEJ VÝVOJOVEJ TOXICITY**

1. **METÓDA**

Táto metóda zodpovedá OECD TG 414 (2001).

1.1. ÚVOD

Táto metóda na testovanie vývojovej toxicity je určená na poskytnutie všeobecnej informácie týkajúcej sa účinkov prenatálnej expozície na gravidné pokusné zviera a na vývoj organizmu v utere; sem môže patriť hodnotenie účinkov na matku, ako aj uhynutie, štrukturálne abnormality alebo poruchy rastu plodu. Funkčné poruchy, aj keď sú dôležitou časťou vývoja, nie sú integrálnou časťou tejto testovacej metódy. Môžu byť testované na tieto účinky v oddelenej štúdii alebo ako doplnok k tejto štúdii, s použitím testovacej metódy pre vývojovú neurotoxicitu. Informácie o testovaní funkčných porúch a iných postnatálnych účinkov sa dajú v prípade potreby získať z testovacej metódy pre dvojgeneračnú štúdiu reprodukčnej toxicity a štúdiu vývojovej neurotoxicity.

Táto testovacia metóda môže vyžadovať, aby sa jednotlivé testy osobitne upravili na základe konkrétnych poznatkov napr. o fyzikálno-chemických alebo toxikologických vlastnostiach testovanej látky. Takáto úprava je prípustná, ak na základe presvedčivého vedeckého dôkazu vyplýva, že úprava vedie k spoľahlivejšiemu testu. V takomto prípade sa tento vedecký dôkaz starostlivo zdokumentuje v správe zo štúdie.

1.2. DEFINÍCIE

Vývojová toxikológia: štúdia nepriaznivých účinkov na vyvíjajúci sa organizmus, ktoré môže zapríčiniť expozícia pred počatím, počas prenatálneho vývoja alebo postnatálne do obdobia sexuálnej zrelosti. K hlavným prejavom vývojovej toxicity patrí 1. smrť organizmu, 2. štrukturálna abnormalita, 3. poruchy rastu a 4. funkčné poruchy. Vývojová toxikológia sa predtým označovala ako teratológia.

Nepriaznivý účinok: každá zmena voči normálnemu stavu v súvislosti s ošetrením, ktorá znižuje schopnosť organizmu prežiť, reprodukovať sa alebo prispôsobovať sa prostrediu. V širšom zmysle vývojová toxikológia zahrnuje každý účinok, ktorý vplýva na normálny vývoj zárodku ako pred narodením, tak aj a po narodení.

Porucha rastu: zmena hmotnosti alebo veľkosti orgánov, alebo tela potomstva.

Zmeny (anomálie): štrukturálne zmeny vo vývoji, ktoré zahrnujú malformácie a aj odchýlky (28).

Malformácia/veľká abnormalita: Štrukturálna zmena, ktorá sa pokladá za škodlivú pre zviera (môže byť tiež smrteľná) a je zvyčajne zriedkavá.

▼B

Odchýlka/malá abnormalita: štrukturálna zmena, o ktorej sa usudzuje, že má malý alebo žiadny škodlivý účinok na zviera; môže byť prechodná a môže sa vyskytovať pomerne často v kontrolnej populácii.

Zárodok: suma derivátov oplodneného vajíčka v každom štádiu vývoja od oplodnenia do narodenia vrátane extraembryonálnych membrán, ako aj embrya alebo plodu.

Implantácia (nidácia): uchytenie blastocysty v epitelovej výstelke uteru, vrátane jej penetrácie cez epitel utera a jej zahniezdenie do endometria.

Embryo: skoré štádium alebo vývojové štádium každého organizmu, najmä vyvíjajúceho sa produktu oplodnenia vajíčka po vzniku pozdĺžnej osi a pokiaľ nie sú prítomné všetky hlavné štruktúry.

Embryotoxicita: škodlivé pre normálnu štruktúru, vývoj, rast a/alebo životaschopnosť embrya.

Plod: nenarodené potomstvo v postembryonálnom období.

Fetotoxicita: škodlivé pre normálnu štruktúru, vývoj, rast a/alebo životaschopnosť plodu.

Potrat: predčasné vypudenie produktov oplodnenia z uteru: embrya alebo neživotaschopného plodu.

Resorpcia: zárodok, ktorý po implantovaní do uteru uhynul a vstrebáva sa alebo sa vstrebal.

Skorá resorpcia: dôkaz implantácie bez toho, aby sa dalo embryo/plod rozoznať.

Neskorá resorpcia: mŕtve embryo alebo plod s vonkajšími degeneratívnymi zmenami.

NOAEL: skratka pre hladinu bez pozorovaného nepriaznivého účinku, je to najvyššia dávka alebo úroveň expozície, pri ktorej sa nepozorujú žiadne nepriaznivé zistenia v súvislosti s ošetrením.

1.3. REFERENČNÁ LÁTKA

Žiadna.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka sa zvyčajne podáva gravidným zvieratám v dobe aspoň od implantácie do jedného dňa pred naplánovaným dňom usmrtenia, ktorý má byť čo možno najbližšie k zvyčajnému dňu pôrodu bez ohrozenia straty údajov následkom predčasnému pôrodu. Testovacia metóda nie je určená iba na skúmanie obdobia organogenézy (t. j. 5 – 15 dní u hlodavcov (myši, potkany, škrečky) a 6 – 18 dní u králikov), ale aj účinkov od obdobia preimplantácie, v prípade potreby, počas celého obdobia gravidity do dňa, keď sa uskutoční cisársky rez. Tesne pred uskutočnením cisárskeho rezu sa samice usmrtia, obsah uteru sa vyšetrí a posúdia sa vonkajšie viditeľné anomálie na plodoch a zmeny na mäkkých tkanivách a kostre.

▼B

1.5. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.5.1. **Výber druhu zvierat**

Odporúča sa, aby sa testovanie uskutočnilo na najvhodnejších druhoch a aby sa použili laboratórne druhy a kmene, ktoré sa zvyčajne používajú pri testovaní prenatálnej vývojovej toxicity. Z hlodavcov sa uprednostňuje potkan a z nehlodavcov králik. Použitie iných druhov je potrebné zdôvodniť.

1.5.2. **Podmienky pre umiestnenie a kŕmenie**

Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C (± 3 °C) pre hlodavce a 18 °C (± 3 °C) pre králiky. Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 % a pokiaľ možno nemala by prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti by mala dosahovať 50 – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé, v rytme 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

Párenie sa uskutoční v klietkach vhodných na tento účel. Aj keď sa uprednostňuje jednotlivé umiestnenie spárených zvierat, spoločné umiestnenie v malých počtoch je tiež prípustné.

1.5.3. **Príprava zvierat**

Použijú sa zdravé zvieratá, ktoré sa aklimatizovali na laboratórne podmienky aspoň 5 dní a ktoré sa predtým nepodrobili iným experimentom. Pokusné zvieratá sa charakterizujú na základe druhu, kmeňa, zdroja, pohlavia, hmotnosti a/alebo veku. Zvieratá vo všetkých pokusných skupinách majú mať, pokiaľ je to možné, rovnakú hmotnosť a vek. Na každú veľkosť dávky sa použijú mladé dospelé, panenské samice. Samice sa spária so samcami rovnakého druhu a kmeňa a je potrebné zabrániť páreniu medzi súrodencami. Pre hlodavce je deň 0 gravidity dňom, keď sa zistila vaginálna zátka a/alebo sperma; pre králiky deň 0 je zvyčajne deň, keď sa uskutočnil koitus alebo umelé oplodnenie, ak sa použila táto technika. Spárené samice sa náhodne rozdelia do kontrolnej a pokusnej skupiny. Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy kvôli umiestneniu klietok. Každému zvieraťu sa priradí vlastné identifikačné číslo. Spárené samice sa náhodne rozdelia do kontrolnej a ošetrenej skupiny a ak sa samice párili v skupinách, zvieratá v každej skupine sa rovnomerne rozdelia do uvedených skupín. Podobne sa rovnomerne rozdelia do skupín samice oplodnené rovnakým samcom.

1.6. POSTUP

1.6.1. **Počet a pohlavie zvierat**

Každá pokusná a kontrolná skupina by mala obsahovať dostatočný počet samíc tak, aby bolo k dispozícii približne 20 samíc s implantačnými miestami na autopsiu. Skupiny, ktoré majú menej ako 16 zvierat s implantačnými miestami, sú nevhodné. Úmrtnosť materských zvierat nevedie nevyhnutne k tomu, že štúdia je neplatná, ak nedosahuje viac ako 10 %.

▼B

1.6.2. **Príprava dávok**

Ak sa na uľahčenie dávkovania používa nosič alebo iná prídavná látka, je potrebné venovať pozornosť týmto charakteristikám: účinky na absorpciu, distribúciu, metabolizmus a retenciu alebo vylúčenie testovanej látky; metódy na chemické vlastnosti testovanej látky, ktorý môže zmeniť jej toxické vlastnosti; a vplyv najvhodnejších spotrebu potravy a vody alebo nutričný stav zvierat. Nosič by nemal spôsobovať vývojovú toxicitu, ani by nemal mať vplyv na reprodukciu.

1.6.3. **Dávkovanie**

Testovaná dávka sa zvyčajne podáva každý deň od implantácie (napr. 5 dní po párení) do dňa naplánovaného uskutočnenia cisárskeho rezu. Ak predbežné štúdie, ktoré sú prípadne dispozícii, neuvádzajú veľkú pravdepodobnosť preimplantačných strát, ošetrenie sa môže predĺžiť na celé obdobie gravidity, od párenia do dňa naplánovaného usmrtenia. Je dobre známe, že nevhodné zaobchádzanie alebo stres počas gravidity môžu mať za následok prenatálne straty. Na ochranu proti prenatálnym stratám zapríčineným faktormi, ktoré nesúvisia s ošetrením, je potrebné zabrániť zbytočnej manipulácii s gravidnými zvieratami, ako aj stresu spôsobenému vonkajšími faktormi, ako napríklad hluk.

Použijú sa aspoň tri veľkosti dávok a uskutoční sa paralelná kontrola. Zdravé zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolnej a pokusnej skupiny. Dávky sa rozložia tak, aby sa toxické účinky zvyšovali. Pokiaľ neexistujú žiadne obmedzenia na základe fyzikálneho/chemického charakteru a biologických vlastností testovanej látky, zvolí sa najvyššia dávka s cieľom vyvolať nejakú vývojovú toxicitu a/alebo toxicitu u matiek (klinické príznaky alebo úbytok telesnej hmotnosti), ale nie uhynutie alebo silné utrpenie. Aspoň jedna zo prechodných dávok má viesť k minimálnym viditeľným toxickým účinkom. Najnižšia dávka by nemala spôsobiť žiadny prejav toxicity u materských zvierat, ani vývojovej toxicity. Klesajúca postupnosť dávok sa zvolí tak, aby sa preukázala každá reakcia v závislosti od dávkovania a hladina bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL). Intervaly dávkovania s faktorom sperma; až štyri sú často optimálne na stanovenie klesajúceho dávkovania a pridanie štvrtej pokusnej skupiny je často vhodnejšie ako používanie veľmi veľkých intervalov (napr. viac ako faktor 10) medzi dávkami. Aj keď stanovenie NOAEL u matiek je cieľom, štúdie, pri ktorých sa nestanovuje táto hladina, môžu byť tiež prípustné (1).

Veľkosti dávok sa zvolia tak, aby zohľadnili všetky existujúce údaje o toxicite, párili aj ďalšie informácie o metabolizme a toxikokinetike testovanej látky alebo príbuzných materiálov. Tieto informácie napomôžu aj pri preukazovaní vhodnosti režimu dávkovania.

Použije sa paralelná kontrolná skupina. Touto skupinou bude zdanlivo ošetrovaná kontrolná skupina alebo kontrolná skupina ošetrovaná nosičom, ak sa používa nosič na podávanie testovanej látky. Všetkým skupinám sa podáva rovnaký objem buď testovanej látky alebo nosiča. So zvieratami v kontrolnej(-ých) skupine(-ách) sa zaobchádza rovnakým spôsobom ako so zvieratami v pokusných skupinách. Kontrolné skupiny, ktorým sa podáva nosič, viac nosič v najvyššej používanej dávke (ako v skupine s najnižším dávkovaním).

▼B

1.6.4 **Limitný test**

Ak sa na základe testu s orálne podanou jednou dávkou minimálne 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň s použitím postupov uvedených pre túto štúdiu nezistí žiadna pozorovateľná toxicita buď u gravidných zvierat, alebo ich potomkoch a ak sa účinok neočakáva na základe existujúcich údajov (napr. zo štrukturálne a/alebo metabolický príbuzných látok), potom sa môže upustiť od úplnej štúdie s použitím troch dávok. Z predpokladanej expozície ľudí môže vyplývať potreba, aby sa v limitnom teste použili vyššie orálne dávky. Pri iných typoch podávania, ako napr. vdychovaním alebo aplikáciou cez kožu, fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej látky často môžu poukázať a limitovať maximálnu prípustnú úroveň expozície (napríklad aplikácia cez kožu by nemala spôsobiť silnú lokálnu toxicitu).

1.6.5. **Podávanie dávok**

Testovaná látka alebo nosič sa zvyčajne podáva orálne pomocou intubácie. Ak sa použije iná cesta podávania, je potrebné, aby experimentátor uviedol zdôvodnenie a argumenty pre túto voľbu a môžu byť potrebné príslušné úpravy (2) (3) (4). Testovaná látka sa podáva každý deň približne v rovnakom čase.

Dávka pre jednotlivé zvieratá sa zvyčajne zakladá na naposledy zistenej telesnej hmotnosti. Je však potrebné venovať pozornosť pri nastavovaní dávky počas posledného trimestra gravidity. Je potrebné použiť existujúce údaje na výber dávky, aby sa zabránilo nadmernej toxicite matky. Ak sa však zaznamená nadmerná toxicita u ošetrených matiek, tieto zvieratá sa humánnym spôsobom usmrtia. Ak niektoré gravidné zvieratá vykazujú príznaky nadmernej toxicity, je potrebné zvážiť usmrtenie celej skupiny s touto dávkou. Ak sa látka podáva cez sondu, pokiaľ možno sa podá zvieratám ako jednorazová dávka s použitím žalúdkovej sondy alebo vhodnej intubačnej kanyly. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Objem nemá byť vyšší ako 1 ml/100 g telesnej hmotnosti, okrem vodných roztokov, keď sa môže použiť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Ak sa použije ako nosič kukuričný olej, objem nemá byť vyšší ako 0,4 ml/100 g telesnej hmotnosti. Zmeny v aplikovanom objeme sa minimalizujú tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem vo všetkých dávkach.

1.6.6. **Pozorovanie matiek**

Klinické vyšetrenie sa uskutoční a zaznamená aspoň raz za deň, pokiaľ možno v rovnakom(-ých) čase(-och) každý deň pri zohľadnení obdobia, keď sa predpokladajú maximálne účinky po podaní dávky. Stav zvierat sa zaznamená, vrátane mortality, moribundného stavu, trvalých zmien v správaní a všetkých príznakov zjavnej toxicity.

1.6.7. **Telesná hmotnosť a spotreba potravy**

Zvieratá sa odvážia v 0. deň gravidity alebo najneskôr na 3. deň gravidity, ak sú dodané zvieratá od externého chovateľa spárené na základe časových údajov, v prvý deň dávkovania, aspoň každé 3 dni počas obdobia dávkovania a v deň naplánovaného usmrtenia.

▼B

Spotreba potravy sa zaznamená v trojdňových intervaloch a má sa zhodovať s dňami, keď sa zisťuje telesná hmotnosť.

1.6.8. **Vyšetrenie post mortem**

Samice sa usmrtia jeden deň pred očakávaným dňom vrhu. Samice, ktoré vykazujú príznaky potratu alebo predčasného pôrodu pred naplánovaným usmrtením, sa usmrtia a podrobia dôkladnému makroskopickému vyšetreniu.

V čase usmrtenia alebo uhynutia počas štúdie sa matka vyšetrí makroskopicky na všetky štrukturálne abnormality alebo patologické zmeny. Posúdenie matiek počas cisárskeho rezu a následná analýza plodov sa uskutoční podľa možnosti bez vedomosti o tom, či ide o ošetrovanú skupina, aby sa minimalizovalo ovplyvnenie.

1.6.9. **Vyšetrenie obsahu uteru**

Bezprostredne po usmrtení alebo čo najskôr po uhynutí sa odoberie uterus a zistí sa stav gravidity u zvierat. Ak uterus nevykazuje graviditu, je potrebné ho ďalej vyšetriť (napr. farbením sírnikom amónnym pre hlodavce a Salewského farbením alebo vhodnou alternatívnou metódou pre králiky) na potvrdenie negravidného stavu (5).

Gravidný uterus, vrátane cervixu, sa odváži. Nie je potrebné zisťovať hmotnosť gravidného uteru u zvierat, ktoré uhynuli počas štúdie.

Pri gravidných zvieratách sa určí počet žltých teliesok (corpora lutea).

Obsah uteru sa vyšetrí na počet mŕtvych embryí alebo plodov alebo počet životaschopných plodov. Stupeň resorpcie sa opíše, aby sa mohol odhadnúť relatívny čas uhynutia zárodku (pozri oddiel 1.2).

1.6.10. **Vyšetrenie plodov**

Určí sa pohlavie a telesná hmotnosť každého plodu.

Každý plod sa vyšetrí na vonkajšie zmeny (6).

Plody sa vyšetria na zmeny na skelete a mäkkých tkanivách (napr. odchýlky a malformácie alebo anomálie) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Kategorizácia fetálnych zmien sa odporúča, ale nevyžaduje. Keď sa uskutoční kategorizácia, jasne sa stanovia kritériá definujúce každú kategóriu. Je potrebné venovať osobitnú pozornosť reprodukčnému traktu, ktorý by sa mal vyšetriť na príznaky zmien vo vývoji.

V prípade hlodavcov sa pripraví približne polovica vrhu a vyšetrí na zmeny na skelete. Zvyšok sa pripraví a vyšetrí na zmeny mäkkých tkanív s použitím uznaných alebo vhodných metód sériových rezov alebo dôkladných pitevných techník.

▼B

V prípade nehlodavcov, napr. králiky, sa všetky plody vyšetria na zmeny mäkkých tkanív a aj na zmeny na skelete. Telá týchto plodov sa podrobia dôkladnej autopsii na vyšetrenie zmien mäkkých tkanív, ktoré môžu zahrnovať postupy pre ďalšie posúdenie internej štruktúry srdca (25). Hlavy jednej polovice plodov vyšetrených týmto spôsobom sa odstránia a spracujú, aby sa posúdili zmeny mäkkých tkanív (vrátane očí, mozgu, nosového priechodu a jazyka) s použitím štandardných metód sériových rezov (26) alebo rovnako citlivou metódou. Telá týchto plodov a zvyšné neporušené plody sa spracujú a vyšetria na zmeny na skelete s použitím rovnakých metód, ako boli opísané pre hlodavce.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje sa zaprotokolujú jednotlivo pre matky, ako aj pre ich potomstvo a zosumarizujú vo forme tabuliek a uvedie sa pre každú pokusnú skupinu a každú generáciu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat, ktoré uhynuli počas testu, alebo sa usmrtili z humánnych dôvodov, čas každého úmrtia alebo humánneho usmrtenia, počet gravidných samíc, počet zvierat vykazujúcich príznaky toxicity, opis zistených príznakov toxicity, vrátane času nástupu, trvania a závažnosti všetkých toxických účinkov, typy vyšetrení embrya/plodu a všetky údaje týkajúce sa vrhu.

Číselné výsledky sa vyhodnotia vhodnou štatistickou metódou, pričom sa na analýzu údajov ako jednotka použije vrh. Použije sa všeobecne uznávaná štatistická metóda; štatistické metódy sa zvolia ako súčasť plánu štúdie a zdôvodnia sa. Údaje týkajúce sa zvierat, ktoré neprežili do naplánovaného usmrtenia, sa tiež zaznamenajú. Tieto údaje sa môžu zahrnúť do tej skupiny priemerov zvierat, ktorej sa týkajú. Závažnosť údajov, získaných od takýchto zvierat, a teda zahrnutie alebo vylúčenie z priemeru(-ov) ktorejkoľvek skupiny sa zdôvodní a individuálne posúdi.

2.2. VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Zistenia štúdie prenatálnej vývojovej toxicity sa vyhodnotia na základe zistených účinkov. Hodnotenie bude obsahovať tieto informácie:

— výsledky testu na matkách a embryách/plodoch, vrátane posúdenia vzťahu alebo neprítomnosti vzťahu medzi expozíciou zvierat testovanou látkou a výskytom a závažnosťou všetkých zistení,

— kritériá použité na kategorizáciu vonkajších zmien na plode, mäkkých tkanivách a skelete, ak sa uskutočnila kategorizácia,

▼B

— v prípade potreby historické kontrolné údaje na podporu interpretácie výsledkov štúdie,

— počty použité pri výpočte všetkých percent alebo indexov,

— vhodnú štatistickú analýzu zistení zo štúdie, ktoré by v prípade potreby mohli zahrnovať dostatočné informácie o analytickej metóde tak, aby nezávislý kontrolór/štatistik mohol prehodnotiť a zrekonštruovať analýzu.

V každej štúdii, pri ktorej sa nepreukázali žiadne toxické účinky, je potrebné zvážiť ďalšie vyšetrenia na stanovenie absorpcie a biologickej dostupnosti testovanej látky.

2.3. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Štúdia prenatálnej vývojovej toxicity poskytne informácie o účinkoch opakovanej expozície látkou počas gravidity na matkách a na vnútromaternicový vývoj ich potomstva. Výsledky štúdie sa interpretujú v spojitosti so zisteniami zo subchronických, reprodukčných, toxikokinetických a iných štúdií. Aj keď sa dôraz kladie na všeobecnú toxicitu, pokiaľ ide o toxicitu u matky a aj vývojovú toxicitu, výsledky štúdie umožnia do určitej miery rozlíšenie medzi účinkami na vývoj, ktoré sa vyskytnú pri neprítomnosti všeobecnej toxicity, a tých účinkov, ktoré sú vyvolané dávkami, ktoré sú toxické aj pre materské zviera (27).

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať tieto konkrétne informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia vrátane čísla CAS, ak je známe/stanovené,

— čistota.

Nosič (v prípade potreby):

— zdôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda.

Pokusné zvieratá:

— použitý druh a kmeň,

— počet a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.,

— hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku testu.

Podmienky testu:

— zdôvodnenie výberu veľkosti dávok,

— údaje o zložení testovanej látky/príprave krmiva, dosiahnutej koncentrácii, stabilite a homogenite prípravku,

▼B

— údaje o podávaní testovanej látky,

— prepočet koncentrácie testovanej látky v krmive/pitnej vode (ppm) na skutočnú dávku (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), ak je potrebné,

— podmienky prostredia,

— údaje o kvalite krmiva a vody.

Výsledky:

Údaje toxickej reakcie matky podľa dávky okrem iného:

— počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat, ktoré prežili, počet gravidných zvierat a počet zvierat, ktoré potratili, počet zvierat, ktoré predčasne porodili,

— deň uhynutia počas štúdie, alebo či zvieratá prežili do usmrtenia,

— údaje o zvieratách, ktoré neprežili do naplánovaného usmrtenia, sa zaprotokolujú, ale sa nezahrnú do štatistických porovnaní medzi skupinami,

— deň zistenia každého nezvyčajného klinického príznaku a jeho ďalší priebeh,

— telesná hmotnosť, zmena telesnej hmotnosti a hmotnosť gravidného uteru, nepovinne vrátane zmeny telesnej hmotnosti upravenej o hmotnosť gravidného uteru,

— spotreba potravy, a ak sa meria, spotreba vody,

— pitevné nálezy, vrátane hmotnosti uteru,

— zaznamenajú sa hodnoty NOAEL pre účinky na matku a vývoj.

Vývojové údaje o vrhu s implantátmi, vrátane:

— počtu žltých teliesok (corpora lutea),

— počtu implantácií, počtu a percenta živých a mŕtvych plodov a resorpcií,

— počtu a percenta predimplatačných a poimplantačných strát.

Vývojové údaje o vrhu so živými plodmi, vrátane:

— počtu a percenta živého potomstva,

— pomeru pohlaví,

— telesnej hmotnosti plodu, pokiaľ možno podľa pohlavia a pre obe pohlavia spolu,

— vonkajšie malformácie, malformácie mäkkých tkanív a skeletu a iné závažné zmeny,

— kritériá pre kategorizáciu v prípade potreby,

▼B

— celkový počet a percento plodov a vrhov s každou vonkajšou zmenou, zmenou mäkkých tkanív alebo skeletu, ako aj typy výskytov jednotlivých anomálií a iných závažných zmien.

Diskusia k výsledkom

Závery

4. **ODKAZY**

(1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399 – 410.

(2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386 – 398.

(3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 1 – 8.

(4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

(5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimente lle Pathologie 247367.*

(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; 171 – 173.

(8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; 381 – 391.

(9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47; 229 – 242.

(10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.

(11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127; 291 – 306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313 – 320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; 398 – 408.

(14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309 – 316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169 – 181.

▼B

(16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual,* pp. 163 – 173.

(17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411 – 445.

(18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61 – 63.

(19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313 – 355.

(20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181 – 188.

(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton.* Thomas, Springfield, IL.

(22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques,* Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251 – 277.

(23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology,* Vol. 4. Plenum, NY.

(24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233 – 239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37 – 38.

(26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126 – 144.

(27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798 – 63826.

(28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249 – 292.

▼M4

B.32. ŠTÚDIE KARCINOGENITY

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov (TG) 451 (2009). Pôvodné usmernenia TG 451 o štúdiách karcinogenity boli prijaté v roku 1981. Vypracovanie tejto revidovanej testovacej metódy B.32 sa považovalo za potrebné na zohľadnenie najnovšieho vývoja v oblasti starostlivosti o zvieratá a regulačných požiadaviek (2) (3) (4) (5) (6). Aktualizácia tejto testovacej metódy B.32 bola vykonaná súbežne s revíziou kapitoly B.30 tejto prílohy, Štúdie chronickej toxicity, a kapitoly B.33 tejto prílohy, Kombinované štúdie chronickej toxicity/karcinogenity, s cieľom získať ďalšie informácie pomocou zvierat použitých v štúdii a poskytnúť ďalšie podrobné údaje o výbere dávky. Táto testovacia metóda B.32 je vypracovaná na testovanie širokej škály chemikálií vrátane pesticídov a priemyselných chemikálií. Treba však poznamenať, že v prípade liekov sa niektoré podrobnosti a požiadavky môžu líšiť [pozri usmernenia S1B Medzinárodnej konferencie o zosúladení (ICH) o testovaní karcinogenity liekov].

2. Väčšina štúdií karcinogenity sa vykonáva na hlodavcoch a táto testovacia metóda sa preto primárne vzťahuje na štúdie vykonávané na týchto živočíšnych druhoch. Ak sa takéto štúdie budú vyžadovať v prípade nehlodavcov, takisto by sa s príslušnými úpravami mali uplatniť princípy a postupy uvedené v tejto testovacej metóde spolu s princípmi a postupmi uvedenými v kapitole B.27 tejto prílohy, 90-dňová štúdia orálnej toxicity pri nehlodavcoch v opakovaných dávkach (6). Ďalšie usmernenia sú k dispozícii v Usmerňovacom dokumente OECD č. 116 o príprave a vykonávaní štúdií chronickej toxicity a karcinogenity (7).

3. Tri hlavné spôsoby podávania používané v štúdiách karcinogenity sú orálne, dermálne a inhalačné podávanie. Výber spôsobu podávania závisí od fyzikálnych a chemických vlastností testovanej chemikálie a najčastejšieho spôsobu expozície u človeka. Ďalšie informácie o výbere spôsobu expozície sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7).

4. Táto testovacia metóda je zameraná na orálnu expozíciu, ktorá sa v štúdiách karcinogenity používa najčastejšie. Hoci štúdie karcinogenity využívajúce dermálnu alebo inhalačnú expozíciu môžu byť takisto potrebné na hodnotenie zdravotných rizík pre človeka a/alebo sa môžu vyžadovať v určitých regulačných režimoch, oba spôsoby expozície sú do značnej miery technicky zložité. Takéto štúdie budú musieť byť pripravené v závislosti od jednotlivých prípadov, hoci testovacia metóda, ktorá sa tu uvádza na posudzovanie a vyhodnocovanie karcinogenity pri orálnom podávaní, by mohla slúžiť ako základ protokolu pre inhalačné a/alebo dermálne štúdie vzhľadom na odporúčania týkajúce sa období testovania, klinických a patologických parametrov atď. K dispozícii sú usmernenia OECD o podávaní testovaných chemikálií dermálnym (7) a inhalačným spôsobom (7) (8). Pri príprave dlhodobejších štúdií zahŕňajúcich inhalačnú expozíciu je nutné si preštudovať najmä kapitolu B.8 tejto prílohy (9) a kapitolu B.29 tejto prílohy (10) spolu s Usmerňovacím dokumentom OECD o testovaní akútnej inhalačnej toxicity (8). Kapitolu B.9 tejto prílohy (11) je nutné konzultovať v prípade testovania dermálnej expozície.

▼**M4**

5. Štúdia karcinogenity poskytuje informácie o možnej nebezpečnosti pre zdravie, ktorá sa pravdepodobne vyskytne pri opakovanej expozícii v priebehu celej dĺžky života použitého živočíšneho druhu. Štúdia poskytne informácie o toxických účinkoch testovanej chemikálie vrátane potenciálnej karcinogenity a môže indikovať cieľové orgány a možnosť akumulácie. Môže zabezpečiť odhad hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku pre toxické účinky a v prípade negenotoxických karcinogénov pre reakcie na nádory, ktorý možno použiť na stanovenie bezpečnostných kritérií týkajúcich sa expozície človeka. Takisto sa v nej zdôrazňuje nutnosť dôkladných klinických pozorovaní zvierat s cieľom získať čo najväčšie množstvo informácií.

6. Medzi ciele štúdie karcinogenity v rámci tejto testovacej metódy patrí:

— identifikácia karcinogénnych vlastností testovanej chemikálie, ktoré vedú k zvýšenému výskytu nádorov, zvýšenému podielu zhubných nádorov alebo k skráteniu času do výskytu nádorov v porovnaní so súbežnými kontrolnými skupinami,

— identifikácia cieľových orgánov karcinogenity,

— identifikácia času do výskytu nádorov,

— charakterizácia vzťahu medzi dávkou a reakciou v prípade nádorov,

— identifikácia hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL) alebo východiska na stanovenie porovnávacej dávky (BMD),

— extrapolácia karcinogénnych účinkov na úrovne expozície človeka pri nízkych dávkach,

— poskytnutie údajov na testovanie hypotéz týkajúcich sa druhu pôsobenia (2) (7) (12) (13) (14) (15).

ÚVODNÉ ÚVAHY

7. Pri posudzovaní a vyhodnocovaní potenciálnej karcinogenity testovanej chemikálie testovacie laboratórium pred vykonaním štúdie zváži všetky dostupné informácie o testovanej chemikálii s cieľom zamerať prípravu štúdie na účinnejšie testovanie karcinogénneho potenciálu a minimalizovať využívanie zvierat. Informácie a úvahy o druhu pôsobenia podozrivého karcinogénu (2) (7) (12) (13) (14) (15) sú mimoriadne dôležité, lebo optimálne plánovanie sa môže líšiť v závislosti od toho, či je testovaná chemikália známym alebo podozrivým genotoxickým karcinogénom. Ďalšie usmernenia k úvahám o druhu pôsobenia sú uvedené v usmerňovacom dokumente č.116 (7).

8. Informácie, ktoré pomôžu pri príprave štúdie, zahŕňajú identitu, chemickú štruktúru a fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie, výsledky všetkých testov toxicity *in vitro* alebo *in vivo* vrátane testov genotoxicity, predpokladané použitie (použitia) a potenciál pre expozíciu ľudí, dostupné údaje (Q)SAR, údaje o mutagenite/genotoxicite a iné toxikologické údaje o štrukturálne príbuzných chemikáliách, dostupné toxikokinetické údaje

▼M4

(kinetika pri jednej dávke a takisto pri opakovaných dávkach, ak je k dispozícii) a údaje získané z iných štúdií opakovanej expozície. Hodnotenie karcinogenity sa vykoná po získaní prvotných informácií o toxicite z 28-dňového a/alebo 90-dňového testu toxicity v opakovaných dávkach. Krátkodobé testy nástupu a šírenia rakoviny by takisto mohli priniesť užitočné informácie. Stratégiu fázového testovania pri testovaní karcinogenity treba zvážiť ako súčasť celkového hodnotenia potenciálnych nepriaznivých zdravotných účinkov danej testovanej chemikálie (16) (17) (18) (19).

9. Štatistické metódy, ktoré sú vzhľadom na prípravu pokusu a ciele na analýzu výsledkov najprimeranejšie, sa stanovia pred začatím štúdie. Je potrebné zvážiť, či by štatistiky nemali zahŕňať úpravu vzhľadom na prežitie zvierat, analýzu kumulatívnych nádorových rizík súvisiacich s dĺžkou prežitia, analýzu času do progresie nádoru a analýzu v prípade predčasného konca jednej alebo viacerých skupín. Usmernenia o vhodných štatistických analýzach a kľúčové odkazy na medzinárodne uznané štatistické metódy sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7), ako aj v Usmerňovacom dokumente č. 35 o analýze a hodnotení štúdií chronickej toxicity a karcinogenity (20).

10. Pri vykonávaní štúdie karcinogenity je vždy nutné sa riadiť hlavnými zásadami a úvahami uvedenými v Usmerňovacom dokumente OECD č. 19 o rozpoznaní, hodnotení a použití klinických príznakov ako humánnych parametrov pre pokusné zvieratá používané pri hodnotení bezpečnosti (21), najmä v odseku 62. V tomto odseku sa uvádza, že „ak v štúdiách s opakovanými dávkami zviera vykazuje klinické príznaky, ktoré sú progresívne a vedú k ďalšiemu zhoršeniu stavu, je potrebné na základe informácií rozhodnúť, či sa má zviera humánne usmrtiť alebo nie. Pri rozhodovaní treba zvážiť hodnotu informácií, ktoré by sa získali ďalším udržiavaním zvieraťa pri živote v rámci štúdie, v spojitosti s jeho celkovým stavom. Ak sa prijme rozhodnutie, že testovanie zvieraťa bude pokračovať, frekvencia pozorovaní by sa mala podľa potreby zvýšiť. Takisto je možné, bez toho, aby to malo negatívny vplyv na účel testu, dočasne pozastaviť podávanie dávok, ak sa tým zvieraťu uľaví od bolesti alebo utrpenia, alebo znížiť testovaciu dávku.“

11. Podrobné usmernenia a rozbor zásad výberu dávky v štúdiách chronickej toxicity a karcinogenity sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7), ako aj v dvoch publikáciách Medzinárodného inštitútu prírodných vied (International Life Sciences Institute) (22) (23). Základná stratégia výberu dávky závisí od primárneho cieľa alebo cieľov štúdie (odsek 6). Pri výbere vhodných úrovní dávky je potrebné dosiahnuť rovnováhu medzi skríningom nebezpečnosti na jednej strane a charakterizáciou reakcie na nízke dávky a jej významu na druhej strane. To má význam najmä v prípade kombinovanej štúdie chronickej toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 tejto prílohy, odsek 12).

12. Treba zvážiť vykonanie kombinovanej štúdie chronickej toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 tejto prílohy) namiesto samostatného vykonania štúdie chronickej toxicity (kapitola B.30 tejto prílohy) a štúdie karcinogenity (táto testovacia metóda B.32). Kombinovaným testom sa zabezpečí vyššia účinnosť, pokiaľ ide o čas a náklady, ako v prípade vykonania dvoch samostatných štúdií bez toho, aby sa znížila kvalita údajov, či už vo fáze chronickej toxicity alebo vo fáze karcinogenity. V prípade kombinovanej štúdie chronickej toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 tejto prílohy) však treba náležite zohľadniť zásady výberu dávky (odseky 11 a 22 – 25), pričom sa takisto pripúšťa, že v určitých regulačných rámcoch sa môže vyžadovať vykonanie samostatných štúdií.

▼M4

13. Vymedzenie pojmov použitých v súvislosti s touto testovacou metódou je uvedené na konci tejto kapitoly a v usmerňovacom dokumente (GD) č. 116 (7).

PRINCÍP TESTU

14. Niekoľkým skupinám pokusných zvierat sa denne zvyčajne orálne podáva testovaná chemikália v odstupňovaných dávkach po väčšinu dĺžky ich života. Testovanie inhalačným alebo dermálnym spôsobom môže byť takisto vhodné. Na zvieratách sa dôkladne pozorujú príznaky toxicity a tvorba nádorových poškodení. Pitva sa uskutoční aj na zvieratách uhynutých alebo usmrtených počas testovania, tak aj po ukončení testu na zvieratách, ktoré test prežijú.

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

15. Táto testovacia metóda primárne zahŕňa posudzovanie a vyhodnocovanie karcinogenity pri hlodavcoch (odsek 2). Použitie nehlodavcov sa môže zvážiť, ak z dostupných údajov vyplýva, že to má pre predpovedanie zdravotných účinkov u ľudí väčší význam. Výber druhu zvierat je potrebné odôvodniť. Najvhodnejším hlodavcom je potkan, hoci sa môžu použiť aj iné hlodavce, napr. myši. Hoci používanie myší pri testovaní karcinogenity môže mať obmedzený význam (24) (25) (26), niektoré súčasné regulačné programy stále vyžadujú testovanie karcinogenity na myšiach, pokiaľ sa nestanoví, že takáto štúdia nie je z vedeckého hľadiska potrebná. Potkany a myši sú uprednostňované pokusné modely vzhľadom na ich pomerne krátku dĺžku života, ich rozsiahle využívanie vo farmakologických a toxikologických štúdiách, ich náchylnosť na indukciu nádoru a dostupnosť dostatočne charakterizovaných kmeňov. Vzhľadom na tieto charakteristiky je k dispozícii veľké množstvo informácií o ich fyziológii a patológii. Ďalšie informácie o výbere druhov a kmeňa zvierat sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7).

16. Používajú sa mladé zdravé dospelé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Štúdia karcinogenity sa podľa možnosti vykonáva na zvieratách z toho istého kmeňa a zdroja, ako sú zvieratá použité v predbežnej štúdii/štúdiách toxicity v kratšom trvaní, hoci ak je známe, že pri zvieratách z tohto istého kmeňa a zdroja sa pri dlhodobých štúdiách problematicky dosahujú bežne akceptované kritériá prežitia [pozri usmerňovací dokument č. 116 (7)], je nutné zvážiť použitie kmeňa zvierat s prijateľnou mierou prežitia v dlhodobej štúdii. Používajú sa samice, ktoré nikdy nevrhli mláďatá a sú negravidné.

Umiestnenie a kŕmenie

17. Zvieratá môžu byť umiestnené jednotlivo alebo v malých skupinách rovnakého pohlavia v klietkach. Samostatné umiestnenie by sa malo zvážiť iba v prípade, že je to vedecky opodstatnené (27) (28) (29). Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy vzhľadom na ich umiestnenie. Teplota pokusnej miestnosti, kde sú zvieratá umiestnené, by mala byť 22 °C (± 3 °C). Hoci relatívna vlhkosť by mala byť najmenej 30 % a podľa možnosti by nemala presiahnuť 70 %, okrem času čistenia miestnosti, cieľom by mala byť 50 – 60 % vlhkosť. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

▼M4

Potrava musí vyhovovať všetkým výživovým požiadavkám pre testované druhy zvierat a obsah kontaminantov potravy vrátane rezíduí pesticídov, perzistentných organických látok, fytoestrogénov, ťažkých kovov, mykotoxínov a iných kontaminantov, ktoré môžu mať vplyv na výsledky testu, musí byť čo najnižší. Analytické informácie o úrovni živín a kontaminantov potravy by sa mali získavať priebežne, aspoň na začiatku štúdie a pri zmene používanej šarže, a mali by sa uviesť v záverečnej správe. Podobne treba uviesť analytické informácie o pitnej vode použitej v štúdii. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej chemikálie a potrebou splniť výživové požiadavky pri zvieratách v prípade, že sa testovaná chemikália podáva v potrave.

Príprava zvierat

18. Použijú sa zdravé zvieratá, ktoré sa aklimatizovali na laboratórne podmienky aspoň sedem dní a ktoré sa predtým nepodrobili iným pokusom. V prípade hlodavcov sa musí dávkovanie začať čo najskôr po odstavení mláďat a aklimatizácii a podľa možnosti skôr, než zvieratá dovŕšia vek ôsmich týždňov. Pokusné zvieratá sa charakterizujú na základe druhu, kmeňa, zdroja, pohlavia, hmotnosti a veku. Na začiatku štúdie má byť rozdiel medzi hmotnosťami použitých zvierat z každého pohlavia minimálny a pre každé pohlavie zvlášť nemá presahovať ± 20 % priemernej hmotnosti všetkých zvierat v štúdii. Zvieratá sa náhodne zadelia do kontrolných skupín a testovaných skupín. Po randomizácii by medzi jednotlivými skupinami v rámci každého pohlavia nemali byť výrazné rozdiely v priemernej telesnej hmotnosti. Ak existujú štatisticky významné rozdiely, randomizácia by sa podľa možnosti mala zopakovať. Každému zvieraťu sa pridelí jedinečné identifikačné číslo, ktorým sa zviera trvalo označí tetovaním, mikročipovým implantátom alebo inou vhodnou metódou.

POSTUP

Počet zvierat a ich pohlavie

19. Použijú sa obe pohlavia. Použije sa dostatočný počet zvierat, aby bolo možné dôkladné biologické a štatistické hodnotenie. V každej skupine s dávkou a v súbežnej kontrolnej skupine by preto malo byť minimálne 50 zvierat z každého pohlavia. V závislosti od cieľa štúdie je možné zvýšiť štatistickú významnosť kľúčových odhadov tak, že sa zvieratá nerovnomerne rozdelia do jednotlivých skupín s dávkami, pričom v skupinách s nízkou dávkou bude viac ako 50 zvierat, napr. pri odhadovaní karcinogénneho potenciálu pri nízkych dávkach. Treba však uznať, že miernym zvýšením počtu zvierat v skupine sa dosiahne pomerne nízke zvýšenie štatistickej významnosti štúdie. Ďalšie informácie o štatistickom plánovaní štúdie a výbere úrovní dávok s cieľom maximalizovať štatistickú významnosť sú k dispozícii v usmerňovacom dokumente č. 116 (7).

Zabezpečenie priebežného utrácania a satelitných (sentinelových) skupín

20. Ak je to vedecky opodstatnené, v štúdii sa môže počítať s priebežným utrácaním, napr. po 12 mesiacoch, s cieľom získať informácie o progresii nádorových zmien a mechanistické informácie. Ak už takéto informácie o testovanej chemikálii sú k dispozícii z predchádzajúcich štúdií toxicity v opakovaných dávkach, priebežné utrácanie zvierat nie je vedecky opodstatnené. Ak sa v rámci štúdie plánuje priebežné utrácanie zvierat, v každej skupine s dávkou, v ktorej sa plánuje utratenie, je zvyčajne desať zvierat z každého pohlavia, pričom celkový počet zvierat zahrnutých v pláne štúdie by sa mal zvýšiť o počet zvierat, ktoré majú byť utratené pred dokončením štúdie. Na monitorovanie stavu choroby možno počas štúdie v prípade potreby použiť ďalšiu skupinu sentinelových zvierat (zvyčajne päť zvierat z každého pohlavia) (30). Ďalšie usmernenia sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7).

▼M4

Skupiny s dávkami a dávkovanie

21. Usmernenia o všetkých aspektoch výberu dávky a odstupoch medzi jednotlivými úrovňami dávok sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7). Použijú sa aspoň tri veľkosti dávok a uskutoční sa paralelná kontrola. Úroveň dávky zvyčajne vychádza z výsledkov krátkodobejších štúdií v opakovaných dávkach alebo štúdií na zistenie rozsahu, pričom je potrebné prihliadať na existujúce toxikologické a toxikokinetické údaje, ktoré sú o testovanej chemikálii alebo príbuzných chemikáliách k dispozícii.

22. Pokiaľ to dovoľuje fyzikálno-chemický charakter alebo biologické účinky testovanej chemikálie, na identifikáciu hlavných cieľových orgánov a toxických účinkov by sa mala vybrať najvyššia úroveň dávky, ktorá súčasne nebude mať za následok utrpenie, závažnú toxicitu, morbiditu alebo uhynutie. Pri súčasnom zohľadnení faktorov uvedených v odseku 23 by sa mala zvyčajne vybrať najvyššia úroveň dávky preukazujúca toxicitu, o ktorej svedčí napríklad pokles prírastku telesnej hmotnosti (približne o 10 %). V závislosti od cieľov štúdie (pozri odsek 6) však možno vybrať najvyššiu dávku, ktorá je nižšia ako dávka preukazujúca toxicitu, napr. ak dávka vyvoláva daný nepriaznivý účinok, ktorý má však malý vplyv na dĺžku života alebo na telesnú hmotnosť.

23. Úrovne dávok a odstupy medzi úrovňami dávok možno vybrať s cieľom určiť vzťah medzi dávkou a reakciou a v závislosti od druhu pôsobenia testovanej chemikálie hladinu NOAEL alebo iný plánovaný výsledok štúdie, napr. BMD (pozri odsek 25) pri najnižšej úrovni dávky. Medzi faktory, ktoré by sa mali zvážiť pri podávaní nižších dávok, patrí predpokladaný sklon krivky závislosti reakcie od dávky, dávky, pri ktorých môže dochádzať k významným zmenám v metabolizme alebo druhu toxického pôsobenia, keď sa očakáva prahová hodnota alebo keď sa očakáva východisko na extrapoláciu nízkej dávky.

24. Vybraté odstupy medzi úrovňami dávok budú závisieť od vlastností testovanej chemikálie a nemožno ich v rámci tejto testovacej metódy predpísať, ale dobrá účinnosť testov sa často dosahuje, ak sa na stanovenie zostupného dávkovania použijú intervaly dávkovania s faktorom dva až štyri, pričom pridanie štvrtej pokusnej skupiny je často vhodnejšie ako používanie veľmi veľkých intervalov (napr. s faktorom vyšším ako 6 – 10) medzi dávkami. Vo všeobecnosti by sa nemali používať faktory vyššie ako 10 a v prípade, že sa použijú, je nutné tento postup odôvodniť.

25. Ako sa ďalej uvádza v usmerňovacom dokumente č. 116 (7), pri výbere dávky je potrebné zvážiť tieto body:

— známe alebo predpokladné nelinearity alebo inflexné body krivky závislosti reakcie od dávky,

— toxikokinetika a rozsahy dávok, pri ktorých dochádza alebo nedochádza k metabolickej indukcii, nasýteniu alebo nelinearite medzi externými a internými dávkami,

— prekurzorné poškodenia, markery účinkov alebo ukazovatele prebiehajúcich kľúčových základných biologických procesov,

— kľúčové (alebo predpokladané) aspekty druhu pôsobenia, ako sú dávky, pri ktorých začína vznikať cytotoxicita, narúšajú sa hormonálne hladiny, preťažujú sa homeostatické mechanizmy atď.,

▼M4

— oblasti krivky závislosti reakcie od dávky, kde je potrebný veľmi podrobný odhad, napr. v oblasti predpokladanej dávky BMD alebo predpokladanej prahovej úrovne,

— zváženie očakávaných úrovní expozície človeka.

26. Kontrolnou skupinou je skupina, ktorá nebola vystavená účinkom chemikálie, alebo skupina, ktorej sa podáva nosič, ak sa pri podávaní testovanej chemikálie používa nosič. So zvieratami v kontrolnej skupine sa musí zaobchádzať takisto ako so zvieratami v testovaných skupinách, s výnimkou aplikovania testovanej chemikálie. Ak sa použije nosič, kontrolná skupina dostane nosič v najvyššom objeme, aký bol použitý pri skupinách s dávkami. Ak sa testovaná chemikália podáva v potrave a vedie k výraznému zníženiu príjmu potravy v dôsledku zvýšeného nechutenstva, môže byť užitočné použiť ďalšiu súčasne kŕmenú kontrolnú skupinu, ktorá poslúži ako vhodnejšia kontrola.

Príprava dávok a podávanie testovanej chemikálie

27. Testovaná chemikália sa zvyčajne podáva orálne, v potrave alebo pitnej vode alebo cez sondu. Ďalšie informácie o spôsoboch a metódach podávania sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7). Spôsob a metóda podávania závisí od účelu štúdie, fyzikálno-chemických vlastností testovanej chemikálie, jej biodostupnosti a prevládajúceho spôsobu a metódy expozície u človeka. Vybratý spôsob a metódu podávania je potrebné odôvodniť. V záujme zabezpečenia dobrých životných podmienok pre zvieratá sa orálna sonda zvyčajne zvolí iba v prípade látok, pri ktorých spôsob a metóda podávania primerane reprezentuje potenciálnu expozíciu u človeka (napr. v prípade liekov). Potravinové alebo environmentálne chemikálie obsahujúce pesticídy sa zvyčajne podávajú v potrave alebo v pitnej vode. V určitých prípadoch, napr. v prípade expozície na pracovisku, však môže byť vhodnejšie podanie iným spôsobom.

28. Ak je to potrebné, testovaná chemikália sa rozpustí alebo suspenduje vo vhodnom nosiči. Náležitá pozornosť by sa mala venovať nasledujúcim vlastnostiam nosiča a ostatným aditívam: vplyv na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo zadržiavanie testovanej chemikálie, vplyvy na chemické vlastnosti testovanej chemikálie, ktoré môžu zmeniť svoje toxické vlastnosti, vplyv na spotrebu potravy a vody alebo na stav výživy zvierat. Odporúča sa, aby sa vždy, keď je to možné, najskôr zvážilo použitie vodného roztoku/suspenzie, potom roztoku/emulzie v oleji (napr. kukuričný olej) a nakoniec prípadného roztoku v iných nosičoch. Charakteristiky toxicity iných nosičov ako voda musia byť známe. Musia byť k dispozícii informácie o stabilite testovanej chemikálie a homogenite dávkovacích roztokov alebo krmív (podľa potreby) v podmienkach podávania (napr. v potrave).

29. V prípade chemikálií podávaných v potrave alebo pitnej vode je dôležité zabezpečiť, aby množstvá použitej testovanej chemikálie neinterferovali s normálnou výživovou a vodnou bilanciou. V dlhodobých štúdiách toxicity, pri ktorých sa využíva podávanie v potrave, by koncentrácia testovanej chemikálie v krmive zvyčajne nemala presiahnuť horný limit 5 % z celkového množstva krmiva, aby sa zabránilo nutričnej nevyváženosti. Ak je testovaná chemikália podávaná v potrave, môže sa použiť buď konštantná stravná koncentrácia (mg/kg potravy alebo ppm), alebo konštantná úroveň dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa (mg/kg telesnej hmotnosti), ktorá sa vypočíta každý týždeň. Použitú alternatívu je potrebné špecifikovať.

▼M4

30. V prípade orálneho podávania sa zvieratám podávajú dávky testovanej chemikálie denne (sedem dní v týždni), v prípade hlodavcov zvyčajne počas 24 mesiacov (pozri aj odsek 32). Použitie každého iného režimu dávkovania, napr. päť dní v týždni, sa musí odôvodniť. V prípade podávania cez kožu sa zvieratám zvyčajne aplikuje testovaná chemikália najmenej šesť hodín denne, sedem dní v týždni, ako je uvedené v kapitole B.9 tejto prílohy (11), počas 24 mesiacov. Inhalačná expozícia sa vykonáva šesť hodín denne, sedem dní v týždni, ale ak je to odôvodnené, môže sa použiť aj expozícia počas piatich dní v týždni. Obdobie expozície zvyčajne trvá 24 mesiacov. Ak sa v prípade iných hlodavcov ako potkanov použije expozícia oblasti nosa, maximálne trvanie expozície je možné prispôsobiť s cieľom minimalizovať druhovo špecifické utrpenie. Ak sa použije expozícia v trvaní menej ako šesť hodín denne, treba uviesť odôvodnenie. Pozri aj kapitolu B.8 tejto prílohy (9).

31. Ak sa testovaná chemikália zvieratám podáva cez sondu, podáva sa prostredníctvom žalúdočnej sondy alebo vhodnej intubačnej kanyly približne v rovnakom čase každý deň. Zvyčajne sa podáva jedna dávka raz za deň. Ak je napríklad chemikália lokálne dráždivá, je možné zachovať dennú dávku tak, že sa rozdelí a podá v dvoch častiach (dvakrát denne). Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Objem by mal byť podľa možnosti čo najnižší a v prípade hlodavcov by zvyčajne nemal presahovať 1 ml/100 g telesnej hmotnosti (31). Zmeny v aplikovanom objeme sa minimalizujú tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem vo všetkých dávkach. Výnimkou sú potenciálne žieravé alebo dráždivé chemikálie, ktoré je nutné zriediť, aby sa predišlo závažným lokálnym účinkom. Nemalo by sa testovať pri koncentráciách, ktoré sú pravdepodobne žieravé alebo dráždivé pre gastrointestinálny trakt.

Trvanie štúdie

32. Štúdia v prípade hlodavcov zvyčajne trvá 24 mesiacov, čo predstavuje väčšiu časť normálnej dĺžky života zvierat, ktoré sa majú použiť. V závislosti od dĺžky života kmeňa živočíšneho druhu v štúdii možno použiť aj kratšie alebo dlhšie trvanie, ale tento postup je nutné odôvodniť. V prípade určitých kmeňov myší, napr. kmeňov AKR/J, C3H/J alebo C57BL/6J, môže byť vhodná štúdia v trvaní 18 mesiacov. Nasledujúce informácie poskytujú usmernenia k trvaniu, ukončeniu štúdie a prežitiu. Ďalšie usmernenia vrátane úvah o prijateľnosti negatívnej štúdie karcinogenity v súvislosti s prežitím počas štúdie sú uvedené v Usmerňovacom dokumente OECD č. 116 o príprave a vykonávaní štúdií chronickej toxicity a karcinogenity (7).

— Ukončenie štúdie treba zvážiť, ak počet zvierat, ktoré prežili v skupinách s nižšou dávkou alebo v kontrolnej skupine, klesne pod 25 %.

— Ak v dôsledku toxicity predčasne uhynie iba skupina s vysokou dávkou, štúdia by sa nemala ukončiť.

— Prežitie sa pri jednotlivých pohlaviach posudzuje samostatne.

— Trvanie štúdie by nemalo presiahnuť hranicu, pri ktorej už údaje získané pomocou štúdie nepostačujú na vykonanie štatisticky platného vyhodnotenia.

▼M4

POZOROVANIA

33. Pri všetkých zvieratách si treba všímať morbiditu alebo mortalitu, zvyčajne na začiatku a na konci každého dňa vrátane víkendov a sviatkov. Pri zvieratách sa navyše denne kontrolujú špecifické príznaky, ktoré majú toxikologický význam, pričom sa zohľadňuje časový vrchol očakávaných účinkov po dávkovaní v prípade podávania cez sondu. Osobitnú pozornosť treba venovať tvorbe nádorov. Čas nástupu nádoru, lokalizáciu, rozmery, vzhľad a progresiu každého výrazne viditeľného alebo hmatateľného nádoru je nutné zaznamenať.

Telesná hmotnosť, spotreba potravy/vody a účinnosť krmiva

34. Všetky zvieratá sa odvážia na začiatku testu, najmenej raz týždenne počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Spotreba potravy a účinnosť krmiva sa merajú najmenej raz za týždeň počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Ak sa testovaná chemikália podáva vo vode na pitie, spotreba vody sa meria najmenej raz za týždeň počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Merania spotreby vody by sa mali zvážiť aj v prípade štúdií, pri ktorých sa mení pitný režim.

Hematológia, klinická biochémia a iné merania

35. S cieľom maximalizovať informácie získané pomocou štúdie, najmä pokiaľ ide o úvahy týkajúce sa druhu pôsobenia, možno odobrať vzorky krvi na hematológiu a klinickú biochémiu, pričom rozhodnutie o tomto kroku ostáva na vedúcom štúdie. Takisto môže byť vhodné urobiť rozbor moču. Ďalšie usmernenia o význame odberu takýchto vzoriek v rámci štúdie karcinogenity sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7). Ak je to vhodné, odber vzoriek krvi na hematologické vyšetrenia, vyšetrenia klinickej biochémie a rozbor moču sa môže vykonať ako súčasť priebežného utrácania (odsek 20) a na konci štúdie pri minimálne desiatich zvieratách z každého pohlavia v každej skupine. Vzorky krvi sa odoberajú v anestézii zo stanoveného miesta, napríklad vpichom do srdca alebo zo zadnej očnicovej dutiny, a podľa možnosti sa uchovávajú v primeraných podmienkach. Takisto je možné na vyšetrenie pripraviť krvné stery, najmä ak sa zdá, že kostná dreň je cieľovým orgánom, hoci význam takéhoto vyšetrenia pri hodnotení karcinogénneho/onkogénneho potenciálu sa spochybňuje (32).

PATOLÓGIA

Makroskopická pitva

36. Všetky zvieratá v štúdii s výnimkou sentinelových zvierat (pozri odsek 20) a ostatných satelitných zvierat sa podrobujú kompletnej podrobnej makroskopickej pitve, ktorá zahŕňa dôkladné skúmanie vonkajšieho povrchu tela, všetkých telesných otvorov a lebečnej, hrudnej a brušnej dutiny a ich obsahu. Pri sentinelových a ostatných satelitných zvieratách môže byť v závislosti od konkrétneho prípadu potrebná pitva, o ktorej rozhodne vedúci štúdie. Orgánové hmotnosti väčšinou nie sú súčasťou štúdie karcinogenity, keďže geriatrické zmeny a v neskorších štádiách tvorba nádorov znehodnocujú užitočnosť údajov o orgánových hmotnostiach. Môžu však mať veľký význam pri hodnotení váhy dôkazov, najmä v rámci úvah o druhu pôsobenia. Ak sú súčasťou satelitnej štúdie, zozbierajú sa najneskôr do jedného roka od začatia štúdie.

▼M4

37. Tieto tkanivá by sa mali uchovávať v čo najvhodnejšom fixačnom médiu na obidva typy tkanív a na neskoršie histopatologické vyšetrenie (33) (vyšetrenia tkanív v hranatých zátvorkách sú nepovinné):

Všetky makroskopické poškodenia	srdce	pankreas	žalúdok (predný žalúdok, žľaznatý žalúdok)
nadoblička	ileum	prištítne teliesko	[zuby]
aorta	lačník	periférny nerv	semenníky
mozog (vrátane častí predného mozgu, mozočka a predĺženej miechy/mosta)	oblička	hypofýza	týmus
slepé črevo	slzná žľaza (extraorbitálna)	prostata	štítna žľaza
krčok maternice	pečeň	rektum	[jazyk]
koagulačná žľaza	pľúca	slinná žľaza	priedušnica
hrubé črevo	lymfatické uzliny (povrchové aj hlboké)	semenný mechúrik	močový mechúr
dvanástnik	prsná žľaza (povinné pri samiciach, a ak je zrejmé, že možno urobiť disekciu, aj pri samcoch)	kostrové svaly	maternica (vrátane krčka maternice)
nadsemenníky	[horný dýchací trakt vrátane nosa, nosových mušlí a prínosových dutín]	koža	[močovod]
oko (vrátane sietnice)	pažerák	miecha (na troch úrovniach: krčnej, hrudnej a lumbálnej)	[močová rúra]
[stehnová kosť s kĺbom]	[čuchový bulbus]	slezina	vagína
žlčník (v prípade iných druhov zvierat ako potkany)	vaječníky	[hrudná kosť]	prierez kostnej drene a/alebo čerstvý aspirát kostnej drene
Harderova žľaza			

V prípade párových orgánov, ako sú napríklad obličky a nadobličky, sa zachovajú obidva orgány. Z klinických a iných nálezov môže vyplynúť potreba vyšetrenia ďalších následných tkanív. Takisto by sa mali zachovať všetky orgány, ktoré vzhľadom na známe vlastnosti testovanej chemikálie možno považovať za cieľové orgány. V štúdiách, v ktorých sa chemikália podáva dermálne, je zoznam orgánov rovnaký ako v prípade orálneho podávania, pričom je nevyhnutný špecifický odber vzorky a zachovanie kože z miesta aplikácie chemikálie. V inhalačných štúdiách sa zoznam zachovaných a skúmaných tkanív dýchacieho traktu zostaví na základe odporúčaní kapitoly B.8 a kapitoly B.29 tejto prílohy. Pokiaľ ide o orgány/tkanivá (a popri špecificky uchovávaných tkanivách dýchacieho traktu), je potrebné vyšetriť tie isté orgány ako v prípade orálnej expozície.

▼M4

Histopatológia

38. K dispozícii sú usmernenia o dobrej praxi na vykonávanie štúdií toxikologickej patológie (33). Vyšetreniam sa podrobia minimálne tieto tkanivá:

— všetky tkanivá zo skupín s vysokou dávkou a kontrolných skupín,

— všetky tkanivá zo zvierat, ktoré uhynuli alebo boli utratené v priebehu štúdie,

— všetky tkanivá vykazujúce makroskopické abnormality vrátane nádorov,

— ak sú v skupine s vysokou dávkou pozorované histopatologické zmeny súvisiace s aplikáciou chemikálie, tie isté tkanivá sa vyšetria pri všetkých zvieratách zo všetkých skupín s odlišným dávkovaním,

— v prípade párových orgánov, ako sú napríklad obličky alebo nadobličky, sa vyšetria obidva orgány.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

39. Pri všetkých hodnotených parametroch sa uvedú údaje o jednotlivých zvieratách. Navyše všetky údaje sa musia zhrnúť v tabuľkovej forme, pričom ukazujú pre každú testovanú skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat uhynutých počas testu alebo usmrtených z humánnych dôvodov, čas uhynutia alebo humánneho usmrtenia jednotlivých zvierat, počet zvierat, pri ktorých sa prejavili známky toxicity, opis pozorovaných známok toxicity vrátane nábehu, času a prudkosti toxických účinkov, počet zvierat vykazujúcich poškodenie, typy poškodení a percentuálne množstvo zvierat, pri ktorých sa prejavil daný typ poškodenia. Zhrnuté údaje v tabuľkách musia okrem stupňa poškodení udávať priemer a smerodajnú odchýlku (v prípade priebežných údajov o teste) pri zvieratách vykazujúcich toxické účinky alebo poškodenia.

40. Pri interpretácii výsledkov štúdie môžu byť užitočné historické kontrolné údaje, napr. v prípade, ak existujú indikácie, že údaje získané v rámci súbežných kontrol sa výrazne odlišujú v porovnaní s novými údajmi pri kontrolných zvieratách z rovnakého testovacieho zariadenia/kolónie. V prípade hodnotenia historických kontrolných údajov by ich malo predložiť to isté laboratórium a mali by sa vzťahovať na zvieratá rovnakého veku a z toho istého kmeňa vytvoreného v priebehu piatich rokov, ktoré danej štúdii predchádzali.

41. Ak je to možné, numerické výsledky budú spracované vhodne a všeobecne uplatniteľnou metódou. Štatistické metódy a údaje, ktoré budú analyzované, sa vyberú počas plánovania štúdie (odsek 9). Výber musí v prípade potreby počítať s úpravami vzhľadom na prežitie.

Správa o teste

42. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter, čistota a fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje,

▼M4

— zdroj chemikálie,

— číslo šarže,

— certifikát chemickej analýzy.

Nosič (v prípade potreby):

— odôvodnenie výberu nosiča (ak je iný ako voda).

Testovacie zvieratá:

— použitý druh/kmeň a odôvodnenie výberu,

— počet, vek a pohlavie zvierat na začiatku testu,

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.,

— hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku testu.

Podmienky testovania:

— odôvodnenie spôsobu podávania a výberu dávky,

— ak je to použiteľné, štatistické metódy použité na analýzu údajov,

— údaje o príprave testovanej chemikálie/krmiva,

— analytické údaje o dosiahnutej koncentrácii, stabilite a homogenite prípravku,

— spôsob podávania a údaje o podávaní testovanej chemikálie,

— v prípade inhalačných štúdií, či ide o expozíciu oblasti nosa alebo expozíciu celého tela,

— skutočné dávky (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), faktor konverzie z potravy/pitnej vody, koncentrácia testovanej chemikálie (mg/kg alebo ppm), ak je to použiteľné,

— údaje o kvalite potravy a vody.

Výsledky (predloží sa tabuľkové zhrnutie údajov a údaje o jednotlivých zvieratách)

Všeobecné informácie:

— údaje o prežití,

— telesná hmotnosť a zmeny telesnej hmotnosti,

— spotreba potravy, výpočty účinnosti krmiva, pokiaľ sa vykonali, a spotreba vody, ak je to použiteľné,

— toxikokinetické údaje (ak sú dostupné),

— oftalmoskopia (ak je dostupná),

— hematológia (ak je dostupná),

— klinická chémia (ak je dostupná).

▼M4

Klinické nálezy:

— príznaky toxicity,

— rozsah (a ak sa hodnotí, závažnosť) každej abnormality,

— povaha, závažnosť a trvanie klinických pozorovaní (či už prechodných alebo stálych).

Údaje o pitve:

— konečná telesná hmotnosť,

— orgánové hmotnosti a ich pomery, ak je to použiteľné,

— pitevné nálezy, rozsah a závažnosť abnormalít.

Histopatológia:

— nenádorové histopatologické nálezy,

— nádorové histopatologické nálezy,

— korelácia medzi makroskopickými a mikroskopickými nálezmi,

— podrobný opis všetkých histopatologických nálezov súvisiacich s aplikáciou chemikálie vrátane stupňa závažnosti,

— správa o všetkých partnerských hodnoteniach preparátov (sklíčok).

Štatistické spracovanie výsledkov v prípade potreby

Rozbor výsledkov zahŕňajúci:

— rozbor všetkých prístupov modelovania,

— vzťahy medzi dávkou a reakciou,

— historické kontrolné údaje,

— zváženie všetkých informácií o druhu pôsobenia,

— stanovenie BMD, NOAEL alebo LOAEL,

— význam pre človeka.

Závery

LITERATÚRA

1. OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rím, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paríž.

2. EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3. Combes, R. D., 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, S. M., Greig, J. B., Bridges, J. W., a kol. (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145 – 191.

5. Chhabra, R. S., Bucher, J. R., 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. Kapitola B.27 tejto prílohy, Test subchronickej orálnej toxicity: opakovaná 90-dňová štúdia orálnej toxicity u nehlodavcov.

7. OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 a 453 – druhé vydanie. Series on Testing and Assessment No. 116, dostupné na verejnej webovej stránke OECD s usmerneniami na vykonávanie testov na adrese 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, Paríž.

9. Kapitola B.8 tejto prílohy, Subakútna inhalačná toxicita: 28-dňová štúdia.

10. Kapitola B.29 tejto prílohy, Subchronická inhalačná toxicita: 90-dňová štúdia.

11. Kapitola B.9 tejto prílohy, Toxicita po 28–dňovej opakovanej dávke (dermálna).

12. Boobis, A. R., Cohen, S. M., Dellarco, V., McGregor, D., Meek, M. E., 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, S. M., Meek, M. E., Klaunig, J. E., Patton, D. E., a Fenner-Crisp, P. A. (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33: 581 – 589.

14. Holsapple, M. P., Pitot, H. C., Cohen, S. N., Boobis, A. R., Klaunig, J. E., Pastoor, T., Dellarco, V. L., Dragan, Y. P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89: 51 – 56.

15. Meek, E. M., Bucher, J. R., Cohen, S. M., Dellarco, V., Hill, R. N., Lehman-McKemmon, L. D., Longfellow, D. G., Pastoor, T., Seed, J., Patton, D. E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33: 591 – 653.

16. Carmichael, N. G., Barton, H. A., Boobis, A. R., a kol. (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1 – 7.

17. Barton, H. A., Pastoor, T. P., Baetcke, T. a kol. (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, J. E., Boobis, A. R., Blacker, A., a kol. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37 – 68.

19. Cooper, R. L., Lamb, J. S., Barlow, S. M., a kol. (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, Paríž.

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, Paríž.

▼**M4**

22. Rhomberg, L. R., 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, J. A. (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

24. Griffiths, S. A., Parkinson, C., McAuslane, J. A. N., a Lumley, C. E. (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1): 214.

25. Usui, T., Griffiths, S. A., a Lumley, C. E. (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy P. O. F. & Harron D. W. G. (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. s. 279 – 284.

26. Carmichael, N. G., 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. Smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2012 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely, Ú. v. EÚ L 276, 20.10.2010, s. 33.

28. National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

29. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

30. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31. Diehl, K.-H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.-M., van de Vorstenbosch, C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21: 15 – 23.

32. Weingand, K. a kol. (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. a kol. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126 – 131.

▼**M4**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMU

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M4

B.33. KOMBINOVANÁ ŠTÚDIA CHRONICKEJ TOXICITY/KARCINOGENITY

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov (TG) 453 (2009). Pôvodné usmernenia TG 453 boli prijaté v roku 1981. Vypracovanie tejto aktualizovanej testovacej metódy B.33 sa považovalo za potrebné na zohľadnenie najnovšieho vývoja v oblasti starostlivosti o zvieratá a regulačných požiadaviek (1) (2) (3) (4) (5). Aktualizácia tejto testovacej metódy B.33 bola vykonaná súbežne s revíziou kapitoly B.32 tejto prílohy, Štúdie karcinogenity, a kapitoly B.30 tejto prílohy, Štúdie chronickej toxicity, s cieľom získať ďalšie informácie pomocou zvierat použitých v štúdii a poskytnúť ďalšie podrobné údaje o výbere dávky. Táto testovacia metóda je vypracovaná na testovanie širokej škály chemikálií vrátane pesticídov a priemyselných chemikálií. Treba však poznamenať, že v prípade liekov sa niektoré podrobnosti a požiadavky môžu líšiť (pozri usmernenia S1B Medzinárodnej konferencie o zosúladení (ICH) o testovaní karcinogenity liekov).

2. Väčšina štúdií chronickej toxicity a karcinogenity sa vykonáva na hlodavcoch a táto testovacia metóda sa preto primárne vzťahuje na štúdie vykonávané na týchto živočíšnych druhoch. Ak sa takéto štúdie budú vyžadovať v prípade nehlodavcov, takisto sa s príslušnými úpravami môžu uplatniť uvedené princípy a postupy spolu s princípmi a postupmi uvedenými v kapitole B.27 tejto prílohy, 90-dňová štúdia orálnej toxicity pri nehlodavcoch v opakovaných dávkach (6), ako sa uvádza v Usmerňovacom dokumente OECD č. 116 o príprave a vykonávaní štúdií chronickej toxicity a karcinogenity (7).

3. Tri hlavné spôsoby podávania používané v štúdiách chronickej toxicity/karcinogenity sú orálne, dermálne a inhalačné podávanie. Výber spôsobu podávania závisí od fyzikálnych a chemických vlastností testovanej chemikálie a najčastejšieho spôsobu expozície u človeka. Ďalšie informácie o výbere spôsobu expozície sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7).

4. Táto testovacia metóda je zameraná na orálnu expozíciu, ktorá sa v štúdiách chronickej toxicity a karcinogenity používa najčastejšie. Hoci dlhodobé štúdie využívajúce dermálnu alebo inhalačnú expozíciu môžu byť takisto potrebné na hodnotenie zdravotných rizík pre človeka a/alebo sa môžu vyžadovať v určitých regulačných režimoch, oba spôsoby expozície sú do značnej miery technicky zložité. Takéto štúdie budú musieť byť pripravené v závislosti od jednotlivých prípadov, hoci testovacia metóda, ktorá sa tu uvádza na posudzovanie a vyhodnocovanie chronickej toxicity a karcinogenity pri orálnom podávaní, by mohla slúžiť ako základ protokolu pre inhalačné a/alebo dermálne štúdie vzhľadom na odporúčania týkajúce sa období testovania, klinických a patologických parametrov atď. K dispozícii sú usmernenia OECD o podávaní testovaných chemikálií inhalačným (7) (8) a dermálnym spôsobom (7). Pri príprave dlhodobejších štúdií zahŕňajúcich inhalačnú expozíciu je nutné si preštudovať najmä kapitolu B.8 tejto prílohy (9) a kapitolu B.29 tejto prílohy (10) spolu s Usmerňovacím dokumentom OECD o testovaní akútnej inhalačnej toxicity (8). Kapitolu B.9 tejto prílohy (11) je nutné konzultovať v prípade testovania dermálnej expozície.

▼M4

5. Kombinovaná štúdia chronickej toxicity/karcinogenity poskytuje informácie o možnej nebezpečnosti pre zdravie, ktorá sa pravdepodobne vyskytne pri opakovanej expozícii v priebehu celej dĺžky života použitého živočíšneho druhu. Štúdia poskytne informácie o toxických účinkoch testovanej chemikálie vrátane potenciálnej karcinogenity, indikuje cieľové orgány a možnosť akumulácie. Môže zabezpečiť odhad hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku pre toxické účinky a v prípade negenotoxických karcinogénov pre reakcie na nádory, ktorý možno použiť na stanovenie bezpečnostných kritérií týkajúcich sa expozície človeka. Takisto sa v nej zdôrazňuje nutnosť dôkladných klinických pozorovaní zvierat s cieľom získať čo najväčšie množstvo informácií.

6. Medzi ciele štúdie chronickej toxicity/karcinogenity v rámci tejto testovacej metódy patrí:

— identifikácia karcinogénnych vlastností testovanej chemikálie, ktoré vedú k zvýšenému výskytu nádorov, zvýšenému podielu zhubných nádorov alebo k skráteniu času do výskytu nádorov v porovnaní so súbežnými kontrolnými skupinami,

— identifikácia času do výskytu nádorov,

— identifikácia chronickej toxicity testovanej chemikálie,

— identifikácia cieľových orgánov chronickej toxicity a karcinogenity,

— charakterizácia vzťahu medzi dávkou a reakciou,

— identifikácia hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL) alebo východiska na stanovenie porovnávacej dávky (BMD),

— extrapolácia karcinogénnych účinkov na úrovne expozície človeka pri nízkych dávkach,

— predpovedanie účinkov chronickej toxicity na úrovniach expozície človeka,

— poskytnutie údajov na testovanie hypotéz týkajúcich sa druhu pôsobenia (2) (7) (12) (13) (14) (15).

ÚVODNÉ ÚVAHY

7. Pri posudzovaní a vyhodnocovaní potenciálnej karcinogenity a chronickej toxicity testovanej chemikálie testovacie laboratórium pred vykonaním štúdie zváži všetky dostupné informácie o testovanej chemikálii s cieľom zamerať prípravu štúdie na účinnejšie testovanie jej toxikologických vlastností a minimalizovať využívanie zvierat. Informácie a úvahy o druhu pôsobenia podozrivého karcinogénu (2)(7) (12) (13) (14) (15) sú mimoriadne dôležité, lebo optimálne plánovanie sa môže líšiť v závislosti od toho, či je testovaná chemikália známym alebo podozrivým genotoxickým karcinogénom. Ďalšie usmernenia k úvahám o druhu pôsobenia sú uvedené v usmerňovacom dokumente č.116 (7).

8. Informácie, ktoré pomôžu pri príprave štúdie, zahŕňajú identitu, chemickú štruktúru a fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie, akékoľvek informácie o druhu pôsobenia, výsledky všetkých testov toxicity *in vitro* alebo *in vivo* vrátane testov genotoxicity, predpokladané použitie (použitia) a potenciál pre expozíciu ľudí, dostupné údaje (Q)SAR, údaje o mutagenite/genotoxicite a iné toxikologické údaje o štrukturálne príbuzných chemikáliách, dostupné toxikokinetické údaje (kinetika pri jednej dávke a takisto pri opakovaných dávkach, ak je k dispozícii) a údaje získané z iných štúdií

▼M4

opakovanej expozície. Stanovenie chronickej toxicity/karcinogenity sa vykoná až po získaní prvotných informácií o toxicite z 28-dňového a/alebo 90-dňového testu toxicity v opakovaných dávkach. Krátkodobé testy nástupu a šírenia rakoviny by takisto mohli priniesť užitočné informácie. Stratégiu fázového testovania pri testovaní karcinogenity treba zvážiť ako súčasť celkového hodnotenia potenciálnych nepriaznivých zdravotných účinkov danej testovanej chemikálie (16) (17) (18) (19).

9. Štatistické metódy, ktoré sú vzhľadom na prípravu pokusu a ciele na analýzu výsledkov najprimeranejšie, sa stanovia pred začatím štúdie. Je potrebné zvážiť, či by štatistiky nemali zahŕňať úpravu vzhľadom na prežitie zvierat, analýzu kumulatívnych nádorových rizík súvisiacich s dĺžkou prežitia, analýzu času do progresie nádoru a analýzu v prípade predčasného konca jednej alebo viacerých skupín. Usmernenia o vhodných štatistických analýzach a kľúčové odkazy na medzinárodne uznávané štatistické metódy sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7), ako aj v Usmerňovacom dokumente č. 35 o analýze a hodnotení štúdií chronickej toxicity a karcinogenity (20).

10. Pri vykonávaní štúdie karcinogenity je vždy nutné sa riadiť hlavnými zásadami a úvahami uvedenými v Usmerňovacom dokumente OECD o rozpoznaní, hodnotení a použití klinických príznakov ako humánnych parametrov pre pokusné zvieratá používané pri hodnotení bezpečnosti (21), najmä v odseku 62. V tomto odseku sa uvádza, že „ak v štúdiách s opakovanými dávkami zviera vykazuje klinické príznaky, ktoré sú progresívne a vedú k ďalšiemu zhoršeniu stavu, je potrebné na základe informácií rozhodnúť, či sa má zviera humánne usmrtiť alebo nie. Pri rozhodovaní treba zvážiť hodnotu informácií, ktoré by sa získali ďalším udržiavaním zvieraťa pri živote v rámci štúdie, v spojitosti s jeho celkovým stavom. Ak sa prijme rozhodnutie, že testovanie zvieraťa bude pokračovať, frekvencia pozorovaní by sa mala podľa potreby zvýšiť. Takisto je možné, bez toho, aby to malo negatívny vplyv na účel testu, dočasne pozastaviť podávanie dávok, ak sa tým zvieraťu uľaví od bolesti alebo utrpenia, alebo znížiť testovaciu dávku.“

11. Podrobné usmernenia a rozbor zásad výberu dávky v štúdiách chronickej toxicity a karcinogenity sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7), ako aj v dvoch publikáciách Medzinárodného inštitútu prírodných vied (International Life Sciences Institute) (22) (23). Základná stratégia výberu dávky závisí od primárneho cieľa alebo cieľov štúdie (odsek 6). Pri výbere vhodných úrovní dávky je potrebné dosiahnuť rovnováhu medzi skríningom nebezpečnosti na jednej strane a charakterizáciou reakcie na nízke dávky a jej významu na druhej strane. To je v prípade tejto kombinovanej štúdie chronickej toxicity a karcinogenity veľmi dôležité.

12. Treba zvážiť vykonanie tejto kombinovanej štúdie chronickej toxicity a karcinogenity namiesto samostatného vykonania štúdie chronickej toxicity (kapitola B.30 tejto prílohy) a štúdie karcinogenity (kapitola B.32 tejto prílohy). Kombinovaným testom sa zabezpečí vyššia účinnosť, pokiaľ ide o čas a náklady, a o niečo menšie využívanie zvierat ako v prípade vykonania dvoch samostatných štúdií bez toho, aby sa znížila kvalita údajov, či už vo fáze chronickej toxicity alebo vo fáze karcinogenity. V prípade kombinovanej štúdie chronickej toxicity a karcinogenity však treba náležite zohľadniť zásady výberu dávky (odseky 11 a 22 – 26), pričom sa takisto pripúšťa, že v určitých regulačných rámcoch sa môže vyžadovať vykonanie samostatných štúdií. Ďalšie usmernenia o príprave kombinovanej štúdie chronickej toxicity a karcinogenity s cieľom dosiahnuť maximálnu účinnosť štúdie v súvislosti s možnosťami zníženia počtu použitých zvierat, ako aj prostredníctvom zefektívnenia jednotlivých experimentálnych postupov sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7).

▼M4

13. Vymedzenie pojmov použitých v súvislosti s touto testovacou metódou je uvedené na konci tejto kapitoly a v usmerňovacom dokumente (GD) č. 116 (7).

PRINCÍP TESTU

14. Plán štúdie pozostáva z dvoch paralelných fáz, fázy chronickej toxicity a fázy karcinogenity (ich trvania sú uvedené v odsekoch 34 a 35). Testovaná chemikália sa zvyčajne podáva orálne, aj keď môže byť vhodné aj testovanie inhalačnej alebo dermálnej expozície. Počas fázy chronickej toxicity sa testovaná chemikália podáva denne v odstupňovaných dávkach niekoľkým skupinám testovacích zvierat (jedna úroveň dávky na skupinu), zvyčajne počas 12 mesiacov, hoci v závislosti od regulačných požiadaviek možno zvoliť aj dlhšie alebo kratšie obdobia (pozri odsek 34). Vybraté obdobie by malo byť dostatočne dlhé, aby sa mohli prejaviť účinky kumulatívnej toxicity, ale bez toho, aby testovanie zmarili zmeny súvisiace so starnutím zvierat. Plán štúdie môže zahŕňať aj jedno alebo viaceré priebežné utratenia, napr. po troch a šiestich mesiacoch, pričom na doplnenie počtu je možné použiť ďalšie skupiny zvierat (pozri odsek 20). Počas fázy karcinogenity sa testovaná chemikália podáva denne niekoľkým skupinám testovacích zvierat po väčšinu dĺžky ich života. Na zvieratách sa v oboch fázach dôkladne pozorujú príznaky toxicity a tvorba nádorových poškodení. Pitva sa uskutoční na zvieratách uhynutých alebo usmrtených počas testovania, ako aj po ukončení testu na zvieratách, ktoré test prežijú.

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

15. Táto testovacia metóda primárne zahŕňa posudzovanie a vyhodnocovanie chronickej toxicity karcinogenity pri hlodavcoch (odsek 2). Použitie nehlodavcov sa môže zvážiť, ak z dostupných údajov vyplýva, že to má pre predpovedanie zdravotných účinkov u ľudí väčší význam. Výber druhu zvierat je potrebné odôvodniť. Najvhodnejším hlodavcom je potkan, hoci sa môžu použiť aj iné hlodavce, napr. myši. Hoci používanie myší pri testovaní karcinogenity môže mať obmedzený význam (24) (25) (26), niektoré súčasné regulačné programy stále vyžadujú testovanie karcinogenity na myšiach, pokiaľ sa nestanoví, že takáto štúdia nie je z vedeckého hľadiska potrebná. Potkany a myši sú uprednostňované pokusné modely vzhľadom na ich relatívne krátku dĺžku života, ich rozsiahle využívanie vo farmakologických a toxikologických štúdiách, ich náchylnosť na indukciu nádoru a dostupnosť dostatočne charakterizovaných kmeňov. Vzhľadom na tieto charakteristiky je k dispozícii veľké množstvo informácií o ich fyziológii a patológii. Príprava a vykonanie štúdií chronickej toxicity/karcinogenity pri nehlodavcoch, ak sa požadujú, by mali byť založené na zásadách uvedených v tejto testovacej metóde, ako aj na zásadách uvedených v kapitole B.27 tejto prílohy, 90-dňová štúdia orálnej toxicity pri nehlodavcoch v opakovaných dávkach (6). Ďalšie informácie o výbere druhov a kmeňa zvierat sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7).

16. Používajú sa mladé zdravé dospelé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Kombinovaná štúdia chronickej toxicity/karcinogenity sa vykonáva na zvieratách z toho istého kmeňa a zdroja, ako sú zvieratá použité v predbežnej štúdii (štúdiách) toxicity v kratšom trvaní, hoci ak je známe, že pri zvieratách z tohto istého kmeňa a zdroja sa pri dlhodobých štúdiách problematicky dosahujú bežne akceptované kritériá prežitia [pozri usmerňovací dokument č. 116 (7)], je nutné zvážiť použitie kmeňa zvierat s prijateľnou mierou prežitia v dlhodobej štúdii. Používajú sa samice, ktoré nikdy nevrhli mláďatá a sú negravidné.

▼M4

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

17. Zvieratá môžu byť umiestnené jednotlivo alebo v malých skupinách rovnakého pohlavia v klietkach. Samostatné umiestnenie by sa malo zvážiť iba v prípade, že je to vedecky opodstatnené (27) (28) (29). Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy vzhľadom na ich umiestnenie. Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C (± 3 °C). Hoci relatívna vlhkosť by mala byť najmenej 30 % a prednostne by nemala presiahnuť 70 %, okrem času čistenia miestnosti, cieľom by mala byť 50 – 60 % vlhkosť. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Potrava musí vyhovovať všetkým výživovým požiadavkám pre testované druhy zvierat a obsah kontaminantov potravy vrátane rezíduí pesticídov, perzistentných organických látok, fytoestrogénov, ťažkých kovov, mykotoxínov a iných kontaminantov, ktoré môžu mať vplyv na výsledky testu, musí byť čo najnižší. Analytické informácie o úrovni živín a kontaminantov potravy by sa mali získavať priebežne, aspoň na začiatku štúdie a pri zmene používanej šarže, a mali by sa uviesť v záverečnej správe. Podobne treba uviesť analytické informácie o pitnej vode použitej v štúdii. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej chemikálie a potrebou splniť výživové požiadavky pri zvieratách v prípade, že sa testovaná chemikália podáva v potrave.

Príprava zvierat

18. Použijú sa zdravé zvieratá, ktoré sa aklimatizovali na laboratórne podmienky aspoň sedem dní a ktoré sa predtým nepodrobili iným pokusom. V prípade hlodavcov sa musí dávkovanie začať čo najskôr po odstavení mláďat a aklimatizácii a podľa možnosti skôr, než zvieratá dovŕšia vek ôsmich týždňov. Pokusné zvieratá sa charakterizujú na základe druhu, kmeňa, zdroja, pohlavia, hmotnosti a veku. Na začiatku štúdie má byť rozdiel medzi hmotnosťami použitých zvierat z každého pohlavia minimálny a pre každé pohlavie zvlášť nemá presahovať ± 20 % priemernej hmotnosti všetkých zvierat v štúdii. Zvieratá by mali byť postupne zadelené do kontrolných a testovaných skupín. Po randomizácii by medzi jednotlivými skupinami v rámci každého pohlavia nemali byť výrazné rozdiely v priemernej telesnej hmotnosti. Ak existujú štatisticky významné rozdiely, randomizácia by sa podľa možnosti mala zopakovať. Každému zvieraťu sa pridelí jedinečné identifikačné číslo, ktorým sa zviera trvalo označí tetovaním, mikročipovým implantátom alebo inou vhodnou metódou.

POSTUP

Počet zvierat a ich pohlavie

19. Použijú sa obe pohlavia. Použije sa dostatočný počet zvierat, aby bolo možné dôkladné biologické a štatistické hodnotenie. V prípade hlodavcov by preto v každej skupine s dávkou (ako sa uvádza v odseku 22) a v súbežnej kontrolnej skupine určenej pre fázu karcinogenity tejto štúdie malo byť minimálne 50 zvierat z každého pohlavia. V závislosti od cieľa štúdie je možné zvýšiť štatistickú významnosť kľúčových odhadov tak, že sa zvieratá nerovnomerne rozdelia do jednotlivých skupín s dávkami, pričom v skupinách s nízkou dávkou bude viac ako 50 zvierat, napr. pri odhadovaní karcinogénneho potenciálu pri nízkych dávkach. Treba však uznať, že miernym zvýšením počtu zvierat v skupine sa dosiahne pomerne nízke zvýšenie štatistickej významnosti štúdie. V každej skupine s dávkou (ako sa uvádza v odseku 22) a v súbežnej kontrolnej skupine určenej pre

▼M4

fázu chronickej toxicity štúdie by v prípade hlodavcov malo byť minimálne desať zvierat z každého pohlavia. Treba poznamenať, že tento počet je nižší ako pri štúdii chronickej toxicity (kapitola B.30 tejto prílohy). Interpretácia údajov zo zníženého počtu zvierat v skupine vo fáze chronickej toxicity tejto kombinovanej štúdie však bude podložená údajmi z väčšieho počtu zvierat vo fáze karcinogenity štúdie. V štúdiách, v ktorých sa využívajú myši, môže byť na uskutočnenie všetkých požadovaných hematologických vyšetrení potrebné vo fáze chronickej toxicity použiť v každej skupine s dávkou viac zvierat. Ďalšie informácie o štatistickom plánovaní štúdie a výbere úrovní dávok s cieľom maximalizovať štatistickú významnosť sú k dispozícii v usmerňovacom dokumente č. 116 (7).

Zabezpečenie priebežného utrácania, satelitnej skupiny a sentinelových zvierat

20. Ak je to vedecky opodstatnené, v štúdii sa môže počítať s priebežným utrácaním, napr. po šiestich mesiacoch pre fázu chronickej toxicity, s cieľom získať informácie o progresii nenádorových zmien a mechanistické informácie. Ak už takéto informácie o testovanej chemikálii sú k dispozícii z predchádzajúcich štúdií toxicity v opakovaných dávkach, priebežné utrácanie zvierat nie je vedecky opodstatnené. Zvieratá použité vo fáze chronickej toxicity štúdie, zvyčajne v trvaní 12 mesiacov (odsek 34), poskytujú údaje o priebežnom utrácaní pre fázu karcinogenity štúdie, čím sa dosiahne zníženie celkového počtu použitých zvierat. Vo fáze chronickej toxicity štúdie možno použiť aj satelitné skupiny na monitorovanie reverzibility akýchkoľvek toxikologických zmien spôsobených skúmanou testovanou chemikáliou. Tieto skupiny sa môžu obmedzovať na najvyššiu úroveň dávky v štúdii a na kontrolu. Na monitorovanie stavu choroby možno počas štúdie v prípade potreby použiť ďalšiu skupinu sentinelových zvierat (zvyčajne päť zvierat z každého pohlavia) (30). Ďalšie usmernenia o príprave štúdie s cieľom zahrnúť priebežné utrácanie, satelitné a sentinelové zvieratá a súčasne minimalizovať celkový počet použitých zvierat sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7).

21. Ak sa v rámci štúdie plánuje použitie satelitných zvierat a/alebo priebežné utrácanie zvierat, v každej skupine s dávkou zahrnutej na tento účel je zvyčajne desať zvierat z každého pohlavia, pričom celkový počet zvierat zahrnutých v pláne štúdie by sa mal zvýšiť o počet zvierat, ktoré majú byť utratené pred dokončením štúdie. Priebežne utratené zvieratá a satelitné zvieratá sa zvyčajne podrobia tým istým pozorovaniam vrátane pozorovaní telesnej hmotnosti, spotreby potravy/vody, hematologickým meraniam a meraniam klinickej biochémie a patologickým vyšetreniam ako zvieratá vo fáze chronickej toxicity v rámci základnej štúdie, hoci sa takisto môže zabezpečiť, aby sa (v skupinách, v ktorých sa plánuje priebežné utrácanie zvierat) merania obmedzili na špecifické kľúčové ukazovatele, ako je neurotoxicita alebo imunotoxicita.

Skupiny s dávkami a dávkovanie

22. Usmernenia o všetkých aspektoch výberu dávky a odstupoch medzi jednotlivými úrovňami dávok sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7). Pre fázu chronickej toxicity aj fázu karcinogenity sa použijú aspoň tri veľkosti dávok a vykoná sa paralelná kontrola. Úroveň dávky zvyčajne vychádza z výsledkov krátkodobých štúdií v opakovaných dávkach alebo štúdií na zistenie rozsahu, pričom je potrebné prihliadať na existujúce toxikologické a toxikokinetické údaje, ktoré sú o testovanej chemikálii alebo príbuzných chemikáliách k dispozícii.

▼M4

23. Pre fázu chronickej toxicity štúdie nemusí byť potrebné vykonať kompletnú štúdiu s využitím troch úrovní dávok, ak sa predpokladá, že test pri jednej úrovni dávky zodpovedajúcej najmenej 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň pravdepodobne nespôsobí nepriaznivé účinky. Toto rozhodnutie musí byť založené na informáciách z predbežných štúdií a zvážení skutočnosti, že podľa údajov o štrukturálne príbuzných chemikáliách sa toxicita neočakáva. Uplatňuje sa limit 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň s výnimkou prípadu, keď expozícia človeka indikuje potrebu použitia vyššej úrovne dávky.

24. Pokiaľ to dovoľuje fyzikálno-chemický charakter alebo biologické účinky testovanej chemikálie, na identifikáciu hlavných cieľových orgánov a toxických účinkov by sa mala vybrať najvyššia úroveň dávky, ktorá súčasne nebude mať za následok utrpenie, závažnú toxicitu, morbiditu alebo uhynutie. Zvyčajne sa vyberie najvyššia úroveň dávky preukazujúca toxicitu, o ktorej svedčí napríklad pokles prírastku telesnej hmotnosti (o približne 10 %). V závislosti od cieľov štúdie (pozri odsek 6) však možno vybrať najvyššiu dávku, ktorá je nižšia ako dávka preukazujúca toxicitu, napr. ak dávka vyvoláva daný nepriaznivý účinok, ktorý má však malý vplyv na dĺžku života alebo na telesnú hmotnosť.

25. Úrovne dávok a odstupy medzi úrovňami dávok možno vybrať s cieľom určiť vzťah medzi dávkou a reakciou a v závislosti od druhu pôsobenia testovanej chemikálie hladinu NOAEL alebo iný plánovaný výsledok štúdie, napr. BMD (pozri odsek 27). Medzi faktory, ktoré by sa mali zvážiť pri podávaní nižších dávok, patrí predpokladaný sklon krivky závislosti reakcie od dávky, dávky, pri ktorých môže dochádzať k významným zmenám v metabolizme alebo druhu toxického pôsobenia, keď sa očakáva prahová hodnota alebo keď sa očakáva východisko pre extrapoláciu nízkej dávky. Pri kombinovanej štúdii karcinogenity/chronickej toxicity je primárnym cieľom získať informácie na účely hodnotenia rizika karcinogenity, pričom informácie o chronickej toxicite sú zvyčajne vedľajším cieľom. Tento fakt treba mať pri výbere úrovní dávok a odstupov medzi úrovňami dávok v štúdii na pamäti.

26. Vybraté odstupy medzi úrovňami dávok budú závisieť od cieľov štúdie a vlastností testovanej chemikálie a nemožno ich v rámci tejto testovacej metódy podrobne predpísať, ale dobrá účinnosť testov sa často dosahuje, ak sa na stanovenie zostupného dávkovania použijú intervaly dávkovania s faktorom dva až štyri, pričom pridanie štvrtej pokusnej skupiny je často vhodnejšie ako používanie veľmi veľkých intervalov (napr. s faktorom vyšším ako 6 – 10) medzi dávkami. Vo všeobecnosti by sa nemali používať faktory vyššie ako 10 a v prípade, že sa použijú, je nutné tento postup odôvodniť.

27. Ako sa ďalej uvádza v usmerňovacom dokumente č. 116 (7), pri výbere dávky je potrebné zvážiť tieto body:

— známe alebo predpokladané nelinearity alebo inflexné body krivky závislosti reakcie od dávky,

— toxikokinetika a rozsahy dávok, pri ktorých dochádza alebo nedochádza k metabolickej indukcii, nasýteniu alebo nelinearite medzi externými a internými dávkami,

— prekurzorné poškodenia, markery účinkov alebo ukazovatele prebiehajúcich kľúčových základných biologických procesov,

▼M4

— kľúčové (alebo predpokladané) aspekty druhu pôsobenia, ako sú dávky, pri ktorých začína vznikať cytotoxicita, narúšajú sa hormonálne hladiny, preťažujú sa homeostatické mechanizmy atď.,

— oblasti krivky závislosti reakcie od dávky, kde je potrebný veľmi podrobný odhad, napr. v oblasti predpokladanej dávky BMD alebo predpokladanej prahovej úrovne,

— zváženie očakávaných úrovní expozície človeka, najmä pri výbere stredných a nízkych dávok.

28. Kontrolnou skupinou je skupina, ktorá nebola vystavená účinkom chemikálie, alebo skupina, ktorej sa podáva nosič, ak sa pri podávaní testovanej chemikálie používa nosič. So zvieratami v kontrolnej skupine sa musí zaobchádzať takisto ako so zvieratami v testovaných skupinách, s výnimkou aplikovania testovanej chemikálie. Ak sa použije nosič, kontrolná skupina dostane nosič v najvyššom objeme, aký bol použitý pri skupinách s dávkami. Ak sa testovaná chemikália podáva v potrave a vedie k výraznému zníženiu príjmu potravy v dôsledku zvýšeného nechutenstva, môže byť užitočné použiť ďalšiu súčasne kŕmenú kontrolnú skupinu, ktorá poslúži ako vhodnejšia kontrola.

Príprava dávok a podávanie testovanej chemikálie

29. Testovaná chemikália sa zvyčajne podáva orálne, v potrave alebo pitnej vode alebo cez sondu. Ďalšie informácie o spôsoboch a metódach podávania sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7). Spôsob a metóda podávania závisí od účelu štúdie, fyzikálnych/chemických vlastností testovanej chemikálie, jej biodostupnosti a prevládajúceho spôsobu a metódy expozície u človeka. Vybratý spôsob a metódu podávania je potrebné odôvodniť. V záujme zabezpečenia dobrých životných podmienok pre zvieratá sa orálna sonda zvyčajne zvolí iba v prípade látok, pri ktorých spôsob a metóda podávania primerane reprezentuje potenciálnu expozíciu u človeka (napr. v prípade liekov). Potravinové alebo environmentálne chemikálie obsahujúce pesticídy sa zvyčajne podávajú v potrave alebo v pitnej vode. V určitých prípadoch, napr. v prípade expozície na pracovisku, však môže byť vhodnejšie podanie iným spôsobom.

30. Ak je to potrebné, testovaná chemikália sa rozpustí alebo suspenduje vo vhodnom nosiči. Náležitá pozornosť by sa mala venovať nasledujúcim vlastnostiam nosiča a ostatným aditívam: vplyv na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo zadržiavanie testovanej chemikálie, vplyvy na chemické vlastnosti testovanej chemikálie, ktoré môžu zmeniť svoje toxické vlastnosti, vplyv na spotrebu potravy a vody alebo na stav výživy zvierat. Odporúča sa, aby sa vždy, keď je to možné, najskôr zvážilo použitie vodného roztoku/suspenzie, potom roztoku/emulzie v oleji (napr. kukuričný olej) a nakoniec prípadného roztoku v iných nosičoch. Charakteristiky toxicity nosičov iných ako voda musia byť známe. Musia byť k dispozícii informácie o stabilite testovanej chemikálie a homogenite dávkovacích roztokov alebo krmív (podľa potreby) v podmienkach podávania (napr. v potrave).

31. V prípade chemikálií podávaných v potrave alebo pitnej vode je dôležité zabezpečiť, aby množstvá použitej testovanej chemikálie neinterferovali s normálnou výživovou a vodnou bilanciou. V dlhodobých štúdiách toxicity, pri ktorých sa využíva podávanie v potrave, by koncentrácia testovanej chemikálie v krmive zvyčajne nemala presiahnuť horný limit 5 % z celkového množstva krmiva, aby sa zabránilo nutričnej nevyváženosti. Ak je testovaná chemikália podávaná v potrave, môže sa použiť buď konštantná stravná koncentrácia (mg/kg potravy alebo ppm) alebo konštantná úroveň dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa (mg/kg telesnej hmotnosti), ktorá sa vypočíta každý týždeň. Použitú alternatívu je potrebné špecifikovať.

▼M4

32. V prípade orálneho podávania sa zvieratám podávajú dávky testovanej chemikálie denne (sedem dní v týždni) počas 12 mesiacov (fáza chronickej toxicity) alebo 24 mesiacov (fáza karcinogenity), pozri aj odseky 33 a 34. Použitie každého iného režimu dávkovania, napr. päť dní v týždni, sa musí odôvodniť. V prípade podávania cez kožu sa zvieratám zvyčajne aplikuje testovaná chemikália najmenej šesť hodín denne, sedem dní v týždni, ako je uvedené v kapitole B.9 tejto prílohy (11), počas 12 mesiacov (fáza chronickej toxicity) alebo 24 mesiacov (fáza karcinogenity). Inhalačná expozícia sa vykonáva šesť hodín denne, sedem dní v týždni, ale ak je to odôvodnené, môže sa použiť aj expozícia počas piatich dní v týždni. Obdobie expozície zvyčajne trvá 12 mesiacov (fáza chronickej toxicity) alebo 24 mesiacov (fáza karcinogenity). Ak sa v prípade iných hlodavcov ako potkanov použije expozícia oblasti nosa, maximálne trvanie expozície je možné prispôsobiť s cieľom minimalizovať druhovo špecifické utrpenie. Ak sa použije expozícia v trvaní menej ako šesť hodín denne, treba uviesť odôvodnenie. Pozri aj kapitolu B.8 tejto prílohy (9).

33. Ak sa testovaná chemikália zvieratám podáva cez sondu, podáva sa prostredníctvom žalúdočnej sondy alebo vhodnej intubačnej kanyly približne v rovnakom čase každý deň. Zvyčajne sa podáva jedna dávka raz za deň. Ak je napríklad chemikália lokálne dráždivá, je možné zachovať dennú dávku tak, že sa rozdelí a podá v dvoch častiach (dvakrát denne). Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Objem by mal byť podľa možnosti čo najnižší a v prípade hlodavcov by zvyčajne nemal presahovať 1 ml/100 g telesnej hmotnosti (31). Zmeny v aplikovanom objeme sa minimalizujú tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem vo všetkých dávkach. Výnimkou sú potenciálne žieravé alebo dráždivé chemikálie, ktoré je nutné zriediť, aby sa predišlo závažným lokálnym účinkom. Nemalo by sa testovať pri koncentráciách, ktoré sú pravdepodobne žieravé alebo dráždivé pre gastrointestinálny trakt.

Trvanie štúdie

34. Obdobie dávkovania a trvanie fázy chronickej toxicity je zvyčajne 12 mesiacov, hoci plán štúdie možno použiť aj pri štúdiách s kratším (napr. šesť alebo deväť mesiacov) alebo dlhším trvaním (napr. 18 alebo 24 mesiacov) v závislosti od požiadaviek konkrétnych regulačných režimov alebo špecifických mechanistických účelov. Odchýlky od 12-mesačného trvania expozície je potrebné odôvodniť, najmä v prípade kratších trvaní. Všetky skupiny s dávkami umiestnené v tejto fáze budú ukončené v plánovanom čase na účely hodnotenia chronickej toxicity a nenádorovej patológie. Satelitné skupiny zahrnuté s cieľom monitorovať reverzibilitu všetkých toxikologických zmien spôsobených skúmanou testovanou chemikáliou by sa mali zachovať bez dávkovania počas najmenej štyroch týždňov a najviac počas jednej tretiny celkového trvania štúdie po ukončení expozície.

35. Fáza karcinogenity tejto štúdie v prípade hlodavcov zvyčajne trvá 24 mesiacov, čo predstavuje väčšiu časť normálnej dĺžky života zvierat, ktoré sa majú použiť. V závislosti od dĺžky života kmeňa živočíšneho druhu v štúdii možno použiť aj kratšie alebo dlhšie trvanie, ale tento postup je nutné odôvodniť. V prípade určitých kmeňov myší, napr. kmeňov AKR/J, C3H/J alebo C57BL/6J, môže byť vhodná štúdia v trvaní 18 mesiacov. Nasledujúce informácie poskytujú usmernenia k trvaniu, ukončeniu štúdie a prežitiu. Ďalšie usmernenia vrátane úvah o prijateľnosti negatívnej štúdie karcinogenity v súvislosti s prežitím počas štúdie sú uvedené v Usmerňovacom dokumente č. 116 o príprave a vykonávaní štúdií chronickej toxicity a karcinogenity (7):

▼M4

— Ukončenie štúdie treba zvážiť, ak počet zvierat, ktoré prežili v skupinách s nižšou dávkou alebo v kontrolnej skupine, klesne pod 25 %.

— Ak v dôsledku toxicity predčasne uhynie iba skupina s vysokou dávkou, štúdia by sa nemala ukončiť.

— Prežitie sa pri jednotlivých pohlaviach posudzuje samostatne.

— Trvanie štúdie by nemalo presiahnuť hranicu, pri ktorej už údaje získané pomocou štúdie nepostačujú na vykonanie štatisticky platného hodnotenia.

POZOROVANIA (FÁZA CHRONICKEJ TOXICITY)

36. Pri všetkých zvieratách si treba všímať morbiditu alebo mortalitu, zvyčajne na začiatku a na konci každého dňa vrátane víkendov a sviatkov. Všeobecné klinické pozorovania sa vykonávajú najmenej raz denne, najlepšie každý deň v rovnakom čase, vzhľadom na časový vrchol očakávaných účinkov po dávkovaní v prípade podávania cez sondu.

37. Všetky zvieratá sa pred prvou expozíciou najmenej raz podrobia dôkladným klinickým pozorovaniam (aby sa umožnilo porovnávanie jednotlivých zvierat navzájom), potom na konci prvého týždňa štúdie a následne každý mesiac. Protokol o pozorovaniach musí byť pripravený tak, aby sa rozdiely medzi jednotlivými pozorovateľmi minimalizovali a neboli závislé od testovacej skupiny. Tieto pozorovania sa vykonávajú mimo domovskej klietky, radšej v štandardnej aréne a v podobnom čase pri každej príležitosti. Musia byť pozorne zaznamenané, pokiaľ možno s použitím hodnotiaceho systému explicitne vymedzeného testovacím laboratóriom. Je potrebné minimalizovať odlišnosti v podmienkach pozorovaní. Medzi príznaky, ktoré je potrebné si všímať, patria zmeny na koži, srsti, očiach, sliznici, výskyt sekrécie, exkrécie a vegetatívnej aktivity (napr. slzenie, piloerekcia, veľkosť zreničiek, nezvyčajné dýchanie), ale uvedené príznaky nie sú vyčerpávajúce. Zmeny v chôdzi, držaní tela a reakcii na zaobchádzanie, ako aj prítomnosť klonických alebo napätých pohybov, stereotypov (napr. opakované točenie sa), prílišné ošetrovanie sa alebo zvláštne správanie (napr. chôdza dozadu, sebaznetvorenie) sa takisto musia zaznamenať (32).

38. Pred prvým podaním testovanej chemikálie sa pri všetkých zvieratách vykoná oftalmologické vyšetrenie pomocou oftalmoskopu alebo iného vhodného zariadenia. Na konci štúdie sa toto vyšetrenie podľa možnosti vykoná pri všetkých zvieratách, ale minimálne pri zvieratách v skupine s vysokou dávkou a zvieratách v kontrolnej skupine. Ak sa po vystavení zvierat účinkom látky zistia zmeny na očiach, musia byť vyšetrené všetky zvieratá. Ak štrukturálna analýza alebo iné informácie indikujú toxicitu očí, potom je potrebné zvýšiť frekvenciu očných vyšetrení.

39. V prípade chemikálií, pri ktorých predchádzajúce 28-dňové a/alebo 90-dňové testy toxicity v opakovaných dávkach indikovali potenciál vyvolať neurotoxické účinky, sa môže nepovinne vykonať určenie zmyslovej reaktivity podnecovanej rôznymi spôsobmi (32) (napr. zvukovými, zrakovými a proprioceptívnymi podnetmi) (33) (34) (35), hodnotenie sily zovretia (36) a hodnotenie motorickej aktivity (37), a to pred začiatkom štúdie a každé tri mesiace po začatí štúdii počas až 12 mesiacov, ako aj pri ukončení štúdie (ak štúdia trvá dlhšie ako 12 mesiacov). Ďalšie podrobnosti o postupoch, ktoré môžu nasledovať, sú uvedené v príslušných odkazoch. Možno však použiť aj iné alternatívne postupy k postupom, ktoré tu boli opísané.

▼M4

40. V prípade chemikálií, pri ktorých predchádzajúce 28-dňové a/alebo 90-dňové testy toxicity v opakovaných dávkach indikovali potenciál vyvolať imunotoxické účinky, možno nepovinne na konci testu vykonať ďalšie vyšetrenia tohto parametra.

Telesná hmotnosť, spotreba potravy/vody a účinnosť krmiva

41. Všetky zvieratá sa odvážia na začiatku testu, najmenej raz týždenne počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Spotreba potravy a účinnosť krmiva sa merajú najmenej raz za týždeň počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Ak sa testovaná chemikália podáva vo vode na pitie, spotreba vody sa meria najmenej raz za týždeň počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Merania spotreby vody by sa mali zvážiť aj v prípade štúdií, pri ktorých sa mení pitný režim.

Hematológia a klinická biochémia

42. V štúdiách využívajúcich hlodavce sa hematologické vyšetrenia vykonajú pri všetkých zvieratách v štúdii (desiatich samcoch a desiatich samiciach v každej skupine), a to po 3, 6 a 12 mesiacoch, a takisto na konci štúdie (ak štúdia trvá dlhšie ako 12 mesiacov). V prípade myší môžu byť na uskutočnenie všetkých požadovaných hematologických vyšetrení potrebné satelitné zvieratá (pozri odsek 19). V prípade štúdií nehlodavcov sa vzorky odoberú menšiemu počtu zvierat (napr. v prípade štúdií psov štyrom zvieratám z každého pohlavia v každej skupine), a to v priebežných časoch na odber vzoriek a na konci štúdie, podobne ako sa uvádza pri štúdiách hlodavcov. Pri hlodavcoch ani nehlodavcoch nie je nutné vykonať merania po troch mesiacoch, ak v predchádzajúcej 90-dňovej štúdii vykonanej pri porovnateľných úrovniach dávok nebol na hematologických parametroch pozorovaný žiadny účinok. Vzorky krvi sa odoberajú v anestézii zo stanoveného miesta, napríklad vpichom do srdca alebo zo zadnej očnicovej dutiny.

43. Je potrebné vyšetriť tieto parametre (38): celkový a diferenciálny počet leukocytov, počet erytrocytov, počet trombocytov, koncentrácia hemoglobínu, hematokrit, stredný objem erytrocytu (MCV), stredná koncentrácia hemoglobínu v erytrocyte (MCH), stredná farebná koncentrácia hemoglobínu (MCHC), protrombínový čas a aktivovaný parciálny tromboplastínový čas. Podľa potreby sa v závislosti od toxicity testovanej chemikálie môžu merať ďalšie hematologické parametre, ako sú Heinzove telieska alebo iná atypická morfológia erytrocytov alebo methemoglobín. Vo všeobecnosti treba zaujať flexibilný postoj v závislosti od pozorovaného a/alebo očakávaného účinku danej testovanej chemikálie. Ak má testovaná chemikália vplyv na hematopoetický systém, môže byť indikovaný aj počet retikulocytov a cytológia kostnej drene, hoci tieto vyšetrenia sa bežne nemusia vykonávať.

44. Klinická biochémia skúma hlavné toxické účinky na tkanivá a najmä účinky na obličky a pečeň. Vyšetrenie sa uskutočňuje zo vzoriek krvi, ktoré sa odoberú všetkým zvieratám v štúdii (desiatim samcom a desiatim samiciam z každej skupiny) v tých istých časových intervaloch, ako je špecifikované pre hematologické vyšetrenia. V prípade myší môžu byť na uskutočnenie všetkých požadovaných vyšetrení klinickej biochémie potrebné satelitné zvieratá. V prípade štúdií nehlodavcov sa vzorky odoberú menšiemu počtu zvierat (napr. v prípade štúdií psov štyrom zvieratám z každého pohlavia v každej skupine), a to v priebežných časoch na odber vzoriek a na konci štúdie, ako sa uvádza pri štúdiách hlodavcov. Pri hlodavcoch ani nehlodavcoch nie je nutné vykonať merania po troch mesiacoch, ak v predchádzajúcej 90-dňovej štúdii vykonanej pri porovnateľných úrovniach dávok nebol na parametroch klinickej biochémie pozorovaný žiadny účinok.

▼M4

Odporúča sa, aby sa zvieratá (s výnimkou myší) noc pred odobratím vzoriek krvi nekŕmili ([1]). Je potrebné vyšetriť tieto parametre (38): glukóza, močovina (močovinový dusík), kreatinín, celkový obsah bielkovín, albumín, vápnik, sodík, draslík, celkový cholesterol, najmenej dva vhodné testy na hepatocelulárne hodnotenie (alanín-aminotransferáza, aspartát-aminotransferáza, glutamát-dehydrogenáza, celkový obsah žlčových kyselín) (39) a najmenej dva vhodné testy na hepatobiliárne hodnotenie (alkalín-fosfatáza, gama-glutamyl-transferáza, 5-nukleotidáza, celkový bilirubín, celkový obsah žlčových kyselín) (39). Podľa potreby sa v závislosti od toxicity testovanej chemikálie môžu merať ďalšie parametre klinickej chémie, ako je hladina triglyceridov nalačno, špecifické hormóny a cholínsteráza. Vo všeobecnosti treba zaujať flexibilný postoj v závislosti od pozorovaného a/alebo očakávaného účinku danej testovanej chemikálie.

45. Rozbor moču sa vykonáva pri všetkých zvieratách v štúdii (desiatich samcoch a desiatich samiciach v každej skupine) zo vzoriek odobratých v rovnakých intervaloch ako v prípade hematológie a klinickej chémie. Nie je nutné vykonať merania po troch mesiacoch, ak v predchádzajúcej 90-dňovej štúdii vykonanej pri porovnateľných úrovniach dávok nebol v rozbore moču pozorovaný žiadny účinok. Do odborného odporúčania pre štúdie klinickej patológie bol zahrnutý tento zoznam parametrov (38): vzhľad, objem, osmolalita alebo špecifická váha, pH, celkový obsah bielkovín a glukóza. Medzi ostatné parametre patria ketón, urobilinogén, bilirubín a okultné krvácanie. Ďalšie parametre sa môžu použiť, ak je potrebné rozšíriť vyšetrovanie pozorovaných účinkov.

46. Vo všeobecnosti je potrebné určiť základné hematologické ukazovatele a ukazovatele klinickej biochémie pred začatím testovania v štúdiách psov, ale nemusia sa určiť v štúdiách hlodavcov (38). Ak však historické základné údaje (pozri odsek 58) nie sú adekvátne, treba uvažovať o získaní týchto údajov.

PATOLÓGIA

Makroskopická pitva

47. Všetky zvieratá v štúdii sa zvyčajne podrobujú kompletnej podrobnej makroskopickej pitve, ktorá zahŕňa dôkladné skúmanie vonkajšieho povrchu tela, všetkých telesných otvorov a lebečnej, hrudnej a brušnej dutiny a ich obsahu. Môžu sa však takisto zabezpečiť (v prípade priebežného utrácania alebo satelitných skupín), aby sa merania obmedzovali na špecifické kľúčové ukazovatele, ako je neurotoxicita alebo imunotoxicita (pozri odsek 21). Tieto zvieratá sa nemusia podrobiť pitve ani ďalším postupom opísaným v nasledujúcich odsekoch. Pri sentinelových zvieratách môže byť v závislosti od konkrétneho prípadu potrebná pitva, o ktorej rozhodne vedúci štúdie.

([1]) Pri mnohých meraniach v sére a plazme, najmä glukózy, sa uprednostňuje nepodávanie potravy cez noc pred odberom. Hlavným dôvodom je zvýšenie pravdepodobnosti kolísania hodnôt ako nevyhnutný dôsledok prijímania potravy. Môže to viesť k zakrytiu jemnejších účinkov a sťaží to interpretáciu. Treba však poznamenať, že nočný pôst môže rušivo vplývať na celkový metabolizmus zvierat a čiastočne aj na štúdie výživy, a môže to rušiť aj dennú expozíciu testovanej chemikálii. Všetky zvieratá by sa mali posudzovať v rovnakých fyziologických podmienkach, a preto by sa podrobné alebo neurologické hodnotenia podľa možnosti mali naplánovať na iný deň ako odber vzoriek na klinickú biochémiu.

▼**M4**

48. Orgánové hmotnosti by sa mali zistiť pri všetkých zvieratách, s výnimkou tých, ktoré sú vylúčené podľa ďalšej časti odseku 47. Nadobličky, mozog, nadsemenníky, srdce, obličky, pečeň, vaječníky, slezina, semenníky, štítna žľaza (vážená po fixácii, s prištítnymi telieskami) a maternica zo všetkých zvierat (okrem tých, pri ktorých sa zistilo chradnutie alebo ktoré sa priebežne utratili) by sa mali upraviť na priľnavej tkanine a je potrebné čo najrýchlejšie po disekcii zistiť ich mokrú hmotnosť, aby sa predišlo vyschnutiu.

49. Tieto tkanivá by sa mali uchovávať v čo najvhodnejšom fixačnom médiu na obidva typy tkanív a na neskoršie histopatologické vyšetrenie (40) (vyšetrenia tkanív v hranatých zátvorkách sú nepovinné):

Všetky makroskopické poškodenia	srdce	pankreas	žalúdok (predný žalúdok, žľaznatý žalúdok)
nadoblička	ileum	prištítne teliesko	[zuby]
aorta	lačník	periférny nerv	semenníky
mozog (vrátane častí predného mozgu, mozočka a predĺženej miechy/mosta)	oblička	hypofýza	týmus
slepé črevo	slzná žľaza (extraorbitálna)	prostata	štítna žľaza
krčok maternice	pečeň	rektum	[jazyk]
koagulačná žľaza	pľúca	slinná žľaza	priedušnica
hrubé črevo	lymfatické uzliny (povrchové aj hlboké)	semenný mechúrik	močový mechúr
dvanástnik	prsná žľaza (povinné pri samiciach, a ak je zrejmé, že možno urobiť disekciu, aj pri samcoch)	kostrové svaly	maternica (vrátane krčka maternice)
nadsemenníky	[horný dýchací trakt vrátane nosa, nosových mušlí a prínosových dutín]	koža	[močovod]
oko (vrátane sietnice)	pažerák	miecha (na troch úrovniach: krčnej, hrudnej a lumbálnej)	[močová rúra]
[stehnová kosť s kĺbom]	[čuchový bulbus]	slezina	vagína
žlčník (v prípade iných druhov zvierat ako potkany)	vaječníky	[hrudná kosť]	prierez kostnej drene a/alebo čerstvý aspirát kostnej drene
Harderova žľaza			

▼M4

V prípade párových orgánov, ako sú napríklad obličky a nadobličky, sa zachovajú obidva orgány. Z klinických a iných nálezov môže vyplynúť potreba vyšetrenia ďalších tkanív. Takisto by sa mali zachovať všetky orgány, ktoré vzhľadom na známe vlastnosti testovanej chemikálie možno považovať za cieľové orgány. V štúdiách, v ktorých sa chemikália podáva dermálne, sa vyšetria tie isté orgány ako v prípade orálneho podávania, pričom je nevyhnutný špecifický odber vzorky a zachovanie kože z miesta aplikácie chemikálie. V inhalačných štúdiách sa zoznam zachovaných a skúmaných tkanív dýchacieho traktu zostaví na základe odporúčaní kapitoly B.8 tejto prílohy (9) a kapitoly B.29 tejto prílohy (10). Pokiaľ ide o orgány/tkanivá (a popri špecificky uchovávaných tkanivách dýchacieho traktu), je potrebné vyšetriť tie isté orgány ako v prípade orálnej expozície.

Histopatológia

50. K dispozícii sú usmernenia o dobrej praxi na vykonávanie štúdií toxikologickej patológie (40). Histopatologickým vyšetreniam sa podrobia minimálne:

— všetky tkanivá zo skupín s vysokou dávkou a kontrolných skupín,

— všetky tkanivá zo zvierat, ktoré uhynuli alebo boli utratené v priebehu štúdie,

— všetky tkanivá vykazujúce makroskopické abnormality,

— cieľové tkanivá alebo tkanivá, ktoré v skupinách s vysokou dávkou vykazujú zmeny spôsobené aplikáciou chemikálie, zo všetkých zvierat zo všetkých skupín s odlišným dávkovaním,

— v prípade párových orgánov, ako sú napríklad obličky alebo nadobličky, sa vyšetria obidva orgány.

POZOROVANIA (FÁZA KARCINOGENITY)

51. Pri všetkých zvieratách si treba všímať morbiditu alebo mortalitu, zvyčajne na začiatku a na konci každého dňa vrátane víkendov a sviatkov. Pri zvieratách sa navyše raz denne kontrolujú špecifické príznaky, ktoré majú toxikologický význam. V prípade štúdií, v ktorých sa chemikália podáva cez sondu, sa zvieratá kontrolujú okamžite po podaní dávky. Osobitnú pozornosť treba venovať tvorbe nádorov. Čas nástupu nádoru, lokalizáciu, rozmery, vzhľad a progresiu každého výrazne viditeľného alebo hmatateľného nádoru je nutné zaznamenať.

52. Všetky zvieratá sa odvážia na začiatku testu, najmenej raz týždenne počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Spotreba potravy a účinnosť krmiva sa merajú najmenej raz za týždeň počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Ak sa testovaná chemikália podáva vo vode na pitie, spotreba vody sa meria najmenej raz za týždeň počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Merania spotreby vody by sa mali zvážiť aj v prípade štúdií, pri ktorých sa mení pitný režim.

▼M4

Hematológia, klinická biochémia a iné merania

53. S cieľom maximalizovať informácie získané pomocou štúdie, najmä pokiaľ ide o úvahy týkajúce sa druhu pôsobenia, možno odobrať vzorky krvi na hematológiu a klinickú biochémiu, pričom rozhodnutie o tomto kroku ostáva na vedúcom štúdie. Takisto môže byť vhodné urobiť rozbor moču. Údaje o zvieratách použitých vo fáze chronickej toxicity štúdie, zvyčajne v trvaní 12 mesiacov (odsek 34), o týchto parametroch poskytnú informácie. Ďalšie usmernenia o význame odberu takýchto vzoriek v rámci štúdie karcinogenity sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7). Ak sa odoberú vzorky krvi, mali by sa odoberať na konci testovacieho obdobia hneď pred utratením alebo počas utrácania zvierat. Odoberajú sa v anestézii zo stanoveného miesta, napríklad vpichom do srdca alebo zo zadnej očnicovej dutiny. Takisto je možné na vyšetrenie pripraviť krvné stery, najmä ak sa zdá, že kostná dreň je cieľovým orgánom, hoci význam takéhoto vyšetrenia krvných sterov vo fáze karcinogenity pri hodnotení karcinogénneho/onkogénneho potenciálu sa spochybnil (38).

PATOLÓGIA

Makroskopická pitva

54. Všetky zvieratá v štúdii s výnimkou sentinelových zvierat a ostatných satelitných zvierat (pozri odsek 20) sa podrobujú kompletnej podrobnej makroskopickej pitve, ktorá zahŕňa dôkladné skúmanie vonkajšieho povrchu tela, všetkých telesných otvorov a lebečnej, hrudnej a brušnej dutiny a ich obsahu. Pri sentinelových a ostatných satelitných zvieratách môže byť v závislosti od konkrétneho prípadu potrebná pitva, o ktorej rozhodne vedúci štúdie. Orgánové hmotnosti zvyčajne nie sú súčasťou štúdie karcinogenity, keďže geriatrické zmeny a v neskorších štádiách tvorba nádorov znehodnocujú užitočnosť údajov o orgánových hmotnostiach. Môžu však mať veľký význam pri hodnotení váhy dôkazov, najmä v rámci úvah o druhu pôsobenia. Ak sú súčasťou satelitnej štúdie, zozbierajú sa najneskôr do jedného roka od začatia štúdie.

55. Tieto tkanivá by sa mali uchovávať v čo najvhodnejšom fixačnom médiu na obidva typy tkanív a na neskoršie histopatologické vyšetrenie (40) (vyšetrenia tkanív v hranatých zátvorkách sú nepovinné):

Všetky makroskopické poškodenia	srdce	pankreas	žalúdok (predný žalúdok, žľaznatý žalúdok)
nadoblička	ileum	prištítne teliesko	[zuby]
aorta	lačník	periférny nerv	semenníky
mozog (vrátane častí predného mozgu, mozočka a predĺženej miechy/mosta)	oblička	hypofýza	týmus
slepé črevo	slzná žľaza (extraorbitálna)	prostata	štítna žľaza
krčok maternice	pečeň	rektum	[jazyk]
koagulačná žľaza	pľúca	slinná žľaza	priedušnica
hrubé črevo	lymfatické uzliny (povrchové aj hlboké)	semenný mechúrik	močový mechúr

▼M4

dvanástnik	prsná žľaza (povinné pri samiciach, a ak je zrejmé, že možno urobiť disekciu, aj pri samcoch)	kostrové svaly	maternica (vrátane krčka maternice)
nadsemenníky	[horný dýchací trakt vrátane nosa, nosových mušlí a prínosových dutín]	koža	[močovod]
oko (vrátane sietnice)	pažerák	miecha (na troch úrovniach: krčnej, hrudnej a lumbálnej)	[močová rúra]
[stehnová kosť s kĺbom]	[čuchový bulbus]	slezina	vagína
žlčník (v prípade iných druhov zvierat ako potkany)	vaječníky	[hrudná kosť]	prierez kostnej drene a/alebo čerstvý aspirát kostnej drene
Harderova žľaza			

V prípade párových orgánov, ako sú napríklad obličky a nadobličky, sa zachovajú obidva orgány. Z klinických a iných nálezov môže vyplynúť potreba vyšetrenia ďalších tkanív. Takisto by sa mali zachovať všetky orgány, ktoré vzhľadom na známe vlastnosti testovanej chemikálie možno považovať za cieľové orgány. V štúdiách, v ktorých sa chemikália podáva dermálne, sa vyšetria tie isté orgány ako v prípade orálneho podávania, pričom je nevyhnutný špecifický odber vzorky a zachovanie kože z miesta aplikácie chemikálie. V inhalačných štúdiách sa zoznam zachovaných a skúmaných tkanív dýchacieho traktu zostaví na základe odporúčaní kapitoly B.8 tejto prílohy (8) a kapitoly B.29 tejto prílohy (9). Pokiaľ ide o orgány/tkanivá (a popri špecificky uchovávaných tkanivách dýchacieho traktu), je potrebné vyšetriť tie isté orgány ako v prípade orálnej expozície.

Histopatológia

56. K dispozícii sú usmernenia o dobrej praxi na vykonávanie štúdií toxikologickej patológie (40). Vyšetreniam sa podrobia minimálne tieto tkanivá:

— všetky tkanivá zo skupín s vysokou dávkou a kontrolných skupín,

— všetky tkanivá zo zvierat, ktoré uhynuli alebo boli utratené v priebehu štúdie,

— všetky tkanivá vykazujúce makroskopické abnormality vrátane nádorov,

— ak sú v skupine s vysokou dávkou pozorované histopatologické zmeny súvisiace s aplikáciou chemikálie, tie isté tkanivá sa vyšetria pri všetkých zvieratách zo všetkých skupín s odlišným dávkovaním,

— v prípade párových orgánov, ako sú napríklad obličky alebo nadobličky, sa vyšetria obidva orgány.

▼**M4**

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV (KARCINOGENITA A CHRONICKÁ TOXICITA)

Údaje

57. Pri všetkých hodnotených parametroch sa uvedú údaje o jednotlivých zvieratách. Navyše všetky údaje sa musia zhrnúť v tabuľkovej forme, pričom ukazujú pre každú testovanú skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat uhynutých počas testu alebo usmrtených z humánnych dôvodov, čas uhynutia alebo humánneho usmrtenia jednotlivých zvierat, počet zvierat, pri ktorých sa prejavili známky toxicity, opis pozorovaných známok toxicity vrátane nábehu, času a prudkosti toxických účinkov, počet zvierat vykazujúcich poškodenie, typy poškodení a percentuálne množstvo zvierat, pri ktorých sa prejavil daný typ poškodenia. Zhrnuté údaje v tabuľkách musia okrem stupňa poškodení udávať priemer a smerodajnú odchýlku (v prípade priebežných údajov o teste) pri zvieratách vykazujúcich toxické účinky alebo poškodenia.

58. Pri interpretácii výsledkov štúdie môžu byť užitočné historické kontrolné údaje, napr. v prípade, ak existujú indikácie, že údaje získané v rámci súbežných kontrol sa výrazne odlišujú v porovnaní s novými údajmi pri kontrolných zvieratách z rovnakého testovacieho zariadenia/kolónie. V prípade hodnotenia historických kontrolných údajov by ich malo predložiť to isté laboratórium a mali by sa vzťahovať na zvieratá rovnakého veku a z toho istého kmeňa vytvoreného v priebehu piatich rokov, ktoré danej štúdii predchádzali.

59. Ak je to možné, numerické výsledky budú spracované vhodne a všeobecne uplatniteľnou štatistickou metódou. Štatistické metódy a údaje, ktoré budú analyzované, sa vyberú počas plánovania štúdie (odsek 9). Výber musí v prípade potreby počítať s úpravami vzhľadom na prežitie.

60. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter, čistota a fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje,

— zdroj chemikálie,

— číslo šarže,

— certifikát chemickej analýzy.

Nosič (v prípade potreby):

— odôvodnenie výberu nosiča (ak je iný ako voda).

Testovacie zvieratá:

— použitý druh/kmeň a odôvodnenie výberu,

— počet, vek a pohlavie zvierat na začiatku testu,

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.,

— hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku testu.

▼M4

Podmienky testovania:

— odôvodnenie spôsobu podávania a výberu dávky,

— ak je to použiteľné, štatistické metódy použité na analýzu údajov,

— údaje o príprave testovanej chemikálie/krmiva,

— analytické údaje o dosiahnutej koncentrácii, stabilite a homogenite prípravku,

— spôsob podávania a údaje o podávaní testovanej chemikálie,

— v prípade inhalačných štúdií, či ide o expozíciu oblasti nosa alebo expozíciu celého tela,

— skutočné dávky (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), faktor konverzie z potravy/pitnej vody, koncentrácia testovanej chemikálie (mg/kg alebo ppm), ak je to použiteľné,

— údaje o kvalite potravy a vody.

Výsledky (predloží sa tabuľkové zhrnutie údajov a údaje o jednotlivých zvieratách)

Všeobecné informácie:

— údaje o prežití,

— telesná hmotnosť a zmeny telesnej hmotnosti,

— spotreba potravy, výpočty účinnosti krmiva, pokiaľ sa vykonali, a spotreba vody, ak je to použiteľné,

— toxikokinetické údaje, ak sú dostupné,

— oftalmoskopia (ak je dostupná),

— hematológia (ak je dostupná),

— klinická chémia (ak je dostupná).

Klinické nálezy:

— príznaky toxicity,

— rozsah (a ak sa hodnotí, závažnosť) každej abnormality,

— povaha, závažnosť a trvanie klinických pozorovaní (či už prechodných alebo stálych).

Údaje o pitve:

— konečná telesná hmotnosť,

— orgánové hmotnosti a ich pomery, ak je to použiteľné,

— pitevné nálezy, rozsah a závažnosť abnormalít.

Histopatológia:

— nenádorové histopatologické nálezy,

— nádorové histopatologické nálezy,

▼M4

— korelácia medzi makroskopickými a mikroskopickými nálezmi,

— podrobný opis všetkých histopatologických nálezov súvisiacich s aplikáciou chemikálie vrátane stupňa závažnosti,

— správa o všetkých partnerských hodnoteniach preparátov (sklíčok).

Štatistické spracovanie výsledkov v prípade potreby

Rozbor výsledkov zahŕňajúci:

— rozbor všetkých prístupov modelovania,

— vzťah medzi dávkou a reakciou,

— historické kontrolné údaje,

— zváženie všetkých informácií o druhu pôsobenia,

— stanovenie BMD, NOAEL alebo LOAEL,

— význam pre človeka.

Závery

LITERATÚRA

1. OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rím, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paríž.

2. EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3. Combes, R. D., 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, S. M., Greig, J. B., Bridges, J. W., a kol. (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145 – 191

5. Chhabra, R. S., Bucher, J. R., 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. Kapitola B.27 tejto prílohy, Test subchronickej orálnej toxicity: opakovaná 90-dňová štúdia orálnej toxicity u nehlodavcov.

7. OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – druhé vydanie. Series on Testing and Assessment No. 116, dostupné na verejnej webovej stránke OECD s usmerneniami na vykonávanie testov na adrese 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, Paríž.

9. Kapitola B.8 tejto prílohy. Subakútna inhalačná toxicita: 28-dňová štúdia.

10. Kapitola B.29 tejto prílohy, Subchronická inhalačná toxicita: 90-dňová štúdia.

11. Kapitola B.9 tejto prílohy, Toxicita po 28–dňovej opakovanej dávke (dermálna).

▼**M4**

12. Boobis, A. R., Cohen, S. M., Dellarco, V., McGregor, D., Meek, M. E., 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, S. M., Meek, M. E., Klaunig, J. E., Patton, D. E., Fenner-Crisp, PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33: 581 – 589.

14. Holsapple, M. P., Pitot, H. C., Cohen, S. N., Boobis, A. R., Klaunig, J. E., Pastoor, T., Dellarco, V. L., Dragan, Y. P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89: 51 – 56.

15. Meek, E. M., Bucher, J. R., Cohen, S. M., Dellarco, V., Hill, R. N., Lehman-McKemmon, L. D., Longfellow, D. G., Pastoor, T., Seed, J., Patton D. E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33: 591 – 653.

16. Carmichael, N. G., Barton, H. A., Boobis, A. R. a kol. (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1 – 7.

17. Barton, H. A., Pastoor, T. P., Baetcke, T. a kol. (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, J. E., Boobis, A. R., Blacker, A. a kol. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37 – 68.

19. Cooper, R. L., Lamb, J. S., Barlow, S. M. a kol. (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, Paríž.

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, Paríž.

22. Rhomberg, L. R., 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, S. A., Parkinson, C., McAuslane, J. A. N., a Lumley, C. E. (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1): 214.

25. Usui, T., Griffiths, S. A., a Lumley, C. E. (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy, P. O. F., & Harron, D. W. G. (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. s. 279 – 284.

26. Carmichael, N. G., 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. Smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2012 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely (Ú. v. EÚ L 276, 20.10.2010, s. 33).

28. National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

29. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, december 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

30. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31. Diehl, K.-H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.-M., van de Vorstenbosch, C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21: 15 – 23.

32. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

33. Tupper, D. E., Wallace, R. B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999 – 1003.

34. Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health 9: 691 – 704.

35. Moser, V. C., McDaniel, 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: 267 – 283.

36. Meyer, O. A., Tilson, H. A., Byrd, W. C., Riley, M. T. (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233 – 236.

37. 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.

38. Weingand, K., Brown, G., Hall, R. a kol. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198 – 201.

39. EMEA (návrh) dokument „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity“ (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

40. Crissman, J. W., Goodman, D. G., Hildebrandt, P. K. a kol. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126 – 131.

▼**M4**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMU

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼B

B.34. **JEDNOGENERAČNÝ REPRODUKČNÝ TEST TOXICITY**

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka je podávaná v odstupňovaných dávkach v niekoľkých skupinách samcov a samíc. Samce by mali byť ovplyvňované počas rastu a najmenej jeden úplný cyklus spermatogenézy (približne 56 dní u myší a 70 dní u potkanov) s cieľom vyvolať testovanou látkou nepriaznivé účinky na spermatogenézu.

Samice parentálnej (P) generácie by mali byť vystavené po dobu aspoň dvoch kompletných ovulačných cyklov s cieľom vyvolať testovanou látkou nepriaznivé účinky na ovuláciu. Potom sa zvieratá spária. Testovaná látka sa podáva obom pohlaviam počas periódy párenia a potom len samiciam počas gravidity a počas laktácie. Pre inhalačné vystavenie je potrebné túto metódu modifikovať.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. *Príprava*

Pred testom sú zdravé mladé dospelé zvieratá náhodne rozdelené do skupín vystavenia a kontrolných skupín a označené. Zvieratá sú držané v experimentálnych laboratórnych podmienkach aspoň 5 dní pred testom. Odporúča sa podávať testovanú látku v potrave alebo v pitnej vode. Ostatné spôsoby podávania sú tiež prijateľné. Všetky zvieratá by mali byť vystavené rovnakým spôsobom počas primeranej doby experimentu. Ak sú nosiče alebo ďalšie pomocné látky použité pri dávkovaní, nemali by mať toxický efekt. Dávkovanie by malo byť sedem dní v týždni.

▼B

1.6.2. Pokusné zvieratá

Výber druhov Preferované druhy sú myš a potkan. Mali by byť použité zdravé zvieratá, ktoré neboli predmetom žiadnych testov. Nemali by byť použité kmene s nízkou plodnosťou. Zvieratá by mali byť charakterizované vo vzťahu k druhu, kmeňu, pohlaviu, hmotnosti a/alebo veku.

Samce aj samice by mali byť primerane vyšetrené na stanovenie plodnosti. Všetky testované aj kontrolné zvieratá by mali pred začiatkom podávania testovanej látky odstavené od matky.

Počet a pohlavie

Každá vystavená aj kontrolná skupina by mala obsahovať dostatočný počet zvierat, čo znamená asi 20 gravidných samíc v čase vrhu alebo krátko pred ním.

Cieľom je získať dosť gravidít a potomstva pre zabezpečenie zmysluplného vyhodnotenia potenciálneho účinku testovanej látky na plodnosť, graviditu a správanie matky v P generácii a na kojené mláďatá, rast a vývin F_1 potomstva po odstavení od matky.

1.6.3. Podmienky testu

Potrava a voda by sa mali poskytovať ľubovoľne (ad libidum). Tesne pred vrhom by mali byť samice separované v pôrodných klietkach alebo v klietkach pre matky s poskytnutým materiálom pre hniezdenie.

1.6.3.1. Testované dávky

Mali by byť použité aspoň tri testované dávky a kontrola. Ak je nosič použitý pre podávanie testovanej látky, kontrolná skupina by mala dostávať nosič v najväčšom použitom objeme. Ak testovaná látka spôsobuje redukciu príjmu potravy alebo jej metabolizmu, je potrebné pouvažovať o použití zodpovedajúcej kontrolnej skupiny. V ideálnom prípade, ak neexistuje nejaké obmedzenie kvôli fyzikálnej/chemickej povahe alebo biologickým vlastnostiam testovanej látky, najvyššia dávka by mala indukovať toxické príznaky, ale nie mortalitu v parentálnej (P) generácii. Stredná dávka alebo dávky by mali indukovať minimálne toxické príznaky spôsobené testovanou látkou a najnižšia dávka by nemala indukovať žiadne pozorovateľné nepriaznivé účinky na rodičov alebo potomkov. Ak sa určená dávka podáva sondou alebo v kapsuliach, dávka by mala byť závislá na individuálnej hmotnosti zvierat a prispôsobovaná každý týždeň zmenám hmotnosti. Pre samice počas gravidity môže dávka závisieť od hmotnosti v nultom alebo šiestom dni gravidity, ak je potrebné.

1.6.3.2. Limitný test

V prípade látky s nízkou toxicitou, ak dávka aspoň 1 000 mg/kg neindukuje žiadne negatívne vplyvy na reprodukčnú schopnosť, sledovanie ďalších dávok nie je nevyhnutné. Ak predbežné pokusy s najvyššou dávkou a jasnými toxickými príznakmi na matku nevykazujú nepriaznivý účinok na plodnosť, sledovanie ďalších dávok nie je nevyhnutné.

▼B

1.6.3.3. *Vykonanie testu*

Experimentálny plán

Začiatok denného dávkovania samcom parentálnej (P) generácie by mal byť v piatom až deviatom týždni života, keď by mali byť odstavení od matky a aklimatizovaní aspoň päť dní. U potkanov dávkovanie pokračuje 10 týždňov do periódy párenia (pre myši osem týždňov). Samce môžu byť utratené a vyšetrené na konci periódy párenia alebo môžu byť držané na testovanej diéte pre možnosť druhého vrhu a môžu byť utratené a vyšetrené niekedy na konci pozorovania. Pre parentálne (P) samice sa dávkovanie začína aspoň po piatich dňoch aklimatizácie a pokračuje aspoň dva týždne pred párením. Denné dávkovanie P samíc by malo pokračovať počas trojtýždňovej periódy párenia, gravidity až do odstavenia F_1 potomstva. Do úvahy by sa mala brať modifikácia dávkovacieho plánu na základe iných dostupných informácií o testovanej látke, ako je indukcia metabolizmu alebo bioakumulácia.

Postup pri párení

V reprodukčnom teste toxicity sa môžu použiť pomery párenia 1:1 (jeden samec a jedna samica) alebo 1:2 (jeden samec a dve samice).

Pri pomere párenia 1:1 samica môže byť umiestnená s tým istým samcom, kým sa neprejaví gravidita alebo uplynú tri týždne. Každé ráno by mali byť samice vyšetrené na prítomnosť spermií alebo vaginálnej zátky. Deň 0 gravidity je definovaný ako deň, keď je spozorovaná vaginálna zátka alebo spermie.

Pri bezvýslednom párení by mali byť zvieratá vyšetrené na príčinu neplodnosti.

To znamená možnosť ďalšieho párenia s inými samcami alebo samicami, prípadne mikroskopické vyšetrenie reprodukčných orgánov a overenie ovulačného cyklu alebo spermatogenézy.

Veľkosť vrhu

Ovplyvňovanie zvierat počas testu poskytuje normálnu možnosť vrhu a výchovu potomstva do štádia odstavenia od matky bez štandardizácie vrhov.

Ak je urobená štandardizácia, predpokladajú sa nasledovné postupy. Medzi dňom 1 a 4 po narodení je veľkosť každého vrhu upravená elimináciou plodov navyše, a to selekciou štyroch samcov a štyroch samíc v jednom vrhu.

Ak počet samcov a samíc neumožňuje získať štyri zvieratá z každého pohlavia v jednom vrhu, je akceptovateľná čiastočná úprava (napríklad päť samcov a tri samice). Úprava je nereálna pre vrhy s menej ako ôsmimi plodmi.

▼B

1.6.4. Pozorovania

Počas testovacieho obdobia by malo byť každé zviera pozorované denne aspoň raz. Mali by byť zaznamenané nápadné zmeny správania, príznaky ťažkého alebo oneskoreného vrhu a všetky toxické príznaky, vrátane úmrtnosti. V období pred párením a počas párenia by mala byť denne meraná spotreba potravy. Po vrhu a počas laktácie by mala byť meraná spotreba potravy (a spotreba vody ak je testovaná látka podávaná v pitnej vode) v ten istý deň ako váženie vrhu. P samce a samice by mali byť odvážené prvý deň dávkovania a potom raz týždenne. Tieto pozorovania by mali byť zaznamenávané individuálne pre každé dospelé zviera.

Trvanie gravidity sa počíta odo dňa 0 gravidity. Každý vrh by sa mal čo najskôr po pôrode vyšetriť a stanoviť množstvo a pohlavie plodov, potratov (mŕtvych plodov) živých plodov a prítomnosť výrazných anomálií.

Mŕtve plody a plody utratené v deň 4 by sa mali fixovať a vyšetriť na možné defekty. Živé plody by sa mali spočítať a vrhy odvážiť ráno hneď po narodení, na 4. a 7. deň a potom raz za týždeň do konca pozorovania, keď by mali byť zvieratá odvážené individuálne.

Mali by sa zaznamenať fyzické abnormality a poruchy správania samíc alebo potomstva.

1.6.5. Patológia

1.6.5.1. Pitva

Zvieratá P generácie by sa mali makroskopicky vyšetriť v čase utratenia alebo uhynutia počas testu na všetky štruktúrne abnormality alebo patologické zmeny so špeciálnou pozornosťou na reprodukčné orgány. Mŕtve a chradnúce plody by sa mali vyšetriť na defekty.

1.6.5.2. Histopatológia

Pre mikroskopické vyšetrenie by sa mali fixovať vaječníky, maternica, krček maternice, vagína, semenníky, nadsemenníky, semenné váčky, prostata, koagulačná žľaza, hypofýza, a zasiahnuté orgány všetkých P zvierat. V prípade že tieto orgány neboli vyšetrené v iných testoch s viacerými dávkami, mali by byť mikroskopicky vyšetrené zo všetkých zvierat zo skupiny s najvyššou dávkou a z kontrolnej skupiny a zo zvierat, ktoré uhynuli počas pozorovania.

Orgány vykazujúce abnormality v týchto zvieratách by mali byť potom vyšetrené vo všetkých ostatných P zvieratách. Za týchto okolností by malo byť urobené mikroskopické vyšetrenie všetkých tkanív vykazujúcich výrazné patologické zmeny. Ak sa počas párenia zistila neplodnosť, mali by byť podrobené mikroskopickému vyšetreniu reprodukčné orgány zvierat.

▼B

2. **ÚDAJE**

Údaje by mali byť zhrnuté v tabuľke a udávať pre každú testovaciu skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet plodných samcov, počet gravidných samíc, typy zmien a percento zvierat so všetkými typmi zmien.

Ak je to možné, výsledky by mali byť vyhodnotené vhodnou štatistickou metódou. Môže byť použitá hociktorá uznaná štatistická metóda.

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu má podľa možnosti obsahovať nasledujúce informácie:

— použitý druh/kmeň,

— údaje o toxickej reakcii pri jednotlivých pohlaviach, dávkach, vrátane plodnosti, gravidity a životaschopnosti,

— časy úmrtí počas pozorovania alebo údaje, či zvieratá prežili do plánovaného času na utratenie, alebo do ukončenia testu,

— tabuľku uvádzajúcu údaje o hmotnosti každého vrhu, priemernú hmotnosť plodov a individuálnu hmotnosť plodov na konci testu,

— toxické alebo iné príznaky na reprodukciu, potomstvo a postnatálny rast,

— čas objavenia každého abnormálneho príznaku a jeho ďalší vývoj,

— údaje o hmotnosti pre P zvieratá,

— nálezy pitvy,

— detailný opis všetkých mikroskopických nálezov,

— štatistické spracovanie výsledkov, kde je to vhodné,

— diskusia o výsledkoch,

— interpretácia výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **ODKAZY**

Pozri všeobecný úvod časť B.

▼B

B.35. **DVOJGENERAČNÁ ŠTÚDIA REPRODUKČNEJ TOXICITY**

1. **METÓDA**

Táto metóda zodpovedá OECD TG 416 (2001).

1.1. ÚVOD

Táto metóda pre dvojgeneračné reprodukčné testovanie je navrhnutá tak, aby poskytla všeobecné informácie, ktoré sa týkajú účinkov testovanej látky na integritu a činnosť samčích a samičích reprodukčných systémov, vrátane funkcie pohlavných žliaz, estrálneho cyklu, rozmnožovacieho správania, počatia, gravidity, pôrodu, laktácie a odstavenia a rastu a vývoja potomstva. Štúdia môže poskytnúť informácie aj o účinkoch testovanej látky na neonatálnu morbiditu, mortalitu a predbežné údaje o prenatálnej a postnatálnej vývojovej toxicite a slúži ako usmernenie pre ďalšie testy. Okrem pozorovania rastu a vývoja F_1 generácie je táto testovacia metóda určená aj na posúdenie integrity a činnosti samčích a samičích reprodukčných systémov, ako aj rastu a vývoja F_2 generácie. Za účelom získania ďalších informácií o vývojovej toxicite a funkčných poruchách je možné do tohto protokolu zapracovať tiež ďalšie časti štúdie s použitím metód pre vývojovú toxicitu a/alebo v prípade potreby vývojovú neurotoxicitu, alebo by sa tieto konečné body mohli skúmať v samostatných štúdiách s použitím vhodných testovacích metód.

1.2. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka sa podáva viacerým skupinám samčích a samičích pokusných zvierat v odstupňovaných dávkach. Samcom P generácie sa podáva testovaná látka počas rastu a minimálne počas jedného úplného cyklu spermatogenézy (približne 56 dní u myši a 70 dní u potkana), aby sa zistili nepriaznivé účinky na spermatogenézu. Účinky na spermie sa stanovujú na základe množstva parametrov pre spermie (napr. morfológia spermie a pohyblivosť) a v preparátoch tkanív dôkladným histopatologickým vyšetrením. Ak sú dostupné údaje o spermatogenéze z predchádzajúcej štúdie pri opakovaných dávkach s dostatočným trvaním, napr. 90-dňová štúdia, nie je potrebné do štúdie zahrnúť samce P generácie. Odporúča sa však, aby sa uchovali vzorky alebo digitálne záznamy spermy P generácie na umožnenie neskoršieho posúdenia. Samiciam P generácie sa podáva testovaná látka počas rastu a v priebehu niekoľkých úplných estrálnych cyklov, aby sa dali stanoviť všetky nepriaznivé účinky testovanej látky na normálny priebeh estrálneho cyklu. Testovaná látka sa podáva rodičom (P) počas ich párenia, počas výslednej gravidity a počas odstavenia ich F_1 potomstva. Po odstavení pokračuje podávanie látky F_1 potomstvu počas ich rastu do dospelosti, párenia a narodenia F_2 generácie až do odstavenia F_2 generácie.

Klinické pozorovania a patologické vyšetrenia sa vykonajú na všetkých zvieratách na príznaky toxicity s osobitným dôrazom na účinky na integritu a činnosť samčích a samičích reprodukčných systémov a na rast a vývoj potomstva.

▼B

1.3. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.3.1. **Výber druhu zvierat**

Na testovanie sa prednostne používa potkan. Je potrebné zdôvodniť použitie iných druhov a budú potrebné príslušné úpravy. Kmene s nízkou plodnosťou, alebo o ktorých je známe, že majú vysoký výskyt vývojových porúch, sa nemajú používať. Na začiatku štúdie má byť rozdiel medzi hmotnosťami použitých zvierat minimálny a nemá byť vyšší ako 20 % priemernej hmotnosti každého pohlavia.

1.3.2. **Podmienky pre umiestnenie a kŕmenie**

Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C (± 3 °C). Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 %, a pokiaľ možno, nemala by prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti by mala dosahovať 50 – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé, v rytme 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú primes testovanej látky, keď sa podáva týmto spôsobom.

Zvieratá môžu byť umiestnené jednotlivo alebo v malých skupinách rovnakého pohlavia v klietkach. Párenie sa uskutoční v klietkach, ktoré sú vhodné na tento účel. Po zaznamenaní kopulácie sa spárené samice umiestnia jednotlivo do pôrodných klietok alebo do klietok pre matky. Spárené potkany sa môžu držať aj v malých skupinách a oddeliť jeden alebo dva dni pred pôrodom. Krátko pre termínom vrhu sa spáreným zvieratám poskytne vhodný a definovaný hniezdiaci materiál.

1.3.3. **Príprava zvierat**

Použijú sa zdravé mladé zvieratá, ktoré sa aklimatizovali na laboratórne podmienky aspoň 5 dní a ktoré sa predtým nepodrobili iným pokusom. Pokusné zvieratá sa charakterizujú na základe druhu, kmeňa, zdroja, pohlavia, hmotnosti a/alebo veku. Je potrebné, aby boli známe všetky súrodenecké vzťahy medzi zvieratami, aby sa zabránilo páreniu medzi súrodencami. Zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolnej a ošetrovanej skupiny (odporúča sa rozdelenie podľa telesnej hmotnosti). Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy kvôli umiestneniu klietok. Každému zvieraťu sa priradí vlastné identifikačné číslo. V prípade P generácie sa to uskutoční pred začiatkom dávkovania. V prípade F_1 generácie sa to uskutoční po odstavení zvierat vybratých na párenie. Pre všetky vybraté F1 zvieratá sa uchovajú záznamy s uvedením vrhu, z ktorého pochádzajú. Okrem toho sa odporúča individuálna identifikácia mláďat čo najskôr po narodení, keď sa posudzuje váženie jednotlivých mláďat alebo funkčné testy.

Rodičia (P) majú byť na začiatku dávkovania vo veku 5 až 9 týždňov. Zvieratá vo všetkých pokusných skupinách majú mať, pokiaľ je to možné, rovnakú hmotnosť a vek.

▼B

1.4. POSTUP

1.4.1. **Počet a pohlavie zvierat**

Každá pokusná a kontrolovaná skupina by mala obsahovať dostatočný počet zvierat tak, aby bolo k dispozícii pokiaľ možno 20 gravidných samíc, ktoré rodia, alebo čoskoro budú rodiť. V prípade látok, ktoré spôsobujú neželateľné účinky v súvislosti s ošetrením (napr. sterilitu, nadmernú toxicitu pri vysokej dávke), toto nie je možné. Cieľom je dosiahnuť dostatok gravidít, aby sa zabezpečilo zmysluplné posúdenie potenciálu látky ovplyvniť fertilitu, graviditu a správanie matky a dojčenie, rast a vývoj F_1 potomstva od počatia do zrelosti a vývoj ich potomstva (F_2) do odstavenia. Preto prípad, keď sa nedosiahne potrebný počet gravidných zvierat (t. j. 20), nevedie nevyhnutne k neplatnosti štúdie a posudzuje sa na základe jednotlivých prípadov.

1.4.2. **Príprava dávok**

Odporúča sa, aby sa testovaná látka podávala orálne (v krmive, pitnej vode alebo sondou), pokiaľ sa iná cesta podávania (napr. dermálna alebo inhalačná) nepokladá za vhodnejšiu.

V prípade potreby sa testovaná látka rozpustí alebo rozptýli vo vhodnom nosiči. Odporúča sa, aby sa vždy, keď je to možné, najskôr zvážilo použitie vodného roztoku/suspenzie, potom roztoku/emulzie v oleji (napr. kukuričný olej) a nakoniec prípadného roztoku v iných nosičoch. Pre nosiče, ktoré sú iné ako voda, musia byť známe toxické charakteristiky. Určí sa stabilita testovanej látky v nosiči.

1.4.3. **Dávkovanie**

Použijú sa aspoň tri veľkosti dávky a uskutoční sa paralelná kontrola. Pokiaľ to fyzikálno-chemické vlastnosti alebo biologické účinky testovanej látky pripúšťajú, zvolí sa najvyššia dávka tak, aby spôsobila toxicitu, ale nespôsobila úmrtie alebo silné utrpenie. V prípade nečakanej úmrtnosti, štúdie s mierou úmrtnosti menej ako približne 10 % u rodičov (P) sú zvyčajne ešte stále akceptovateľné. Klesajúca postupnosť veľkosti dávok sa zvolí tak, aby sa preukázala každá reakcia v závislosti od dávkovania a hladina bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL). Intervaly dávkovania s faktorom dva až štyri sú často optimálne na stanovenie klesajúceho dávkovania a pridanie štvrtej pokusnej skupiny je často vhodnejšie ako používanie veľmi veľkých intervalov (napr. viac ako faktor 10) medzi dávkami. V prípade štúdií týkajúcich sa výživy interval medzi dávkami nemá mať vyšší faktor ako 3. Veľkosti dávok sa zvolia pri zohľadnení všetkých existujúcich údajov o toxicite, najmä výsledky zo štúdií pri opakovaných dávkach. Posúdia sa aj všetky dostupné informácie o metabolizme a kinetike testovanej látky alebo príbuzných materiáloch. Okrem toho napomôžu tieto informácie aj pri preukazovaní vhodnosti režimu dávkovania.

▼B

Kontrolnou skupinou môže byť neošetrená skupina alebo skupina, ktorej sa podáva nosič, ak sa pri podávaní testovanej látky používa nosič. Okrem ošetrenia s testovanou látkou sa so zvieratami v kontrolnej skupine zaobchádza rovnakým spôsobom ako so zvieratami v pokusnej skupine. Ak sa používa nosič, kontrolná skupina dostane nosič v najvyššom používanom objeme. Ak sa testovaná látka podáva v krmive a spôsobuje znížený príjem potravy alebo jej využitia, potom sa usudzuje, že je potrebné použiť paralelne kŕmenú kontrolnú skupinu. Údaje z kontrolných štúdií, určených na posúdenie účinkov zníženej spotreby potravy na reprodukčné parametre, sa alternatívne môžu použiť namiesto paralelne kŕmenej kontrolnej skupiny.

Je potrebné venovať pozornosť týmto charakteristikám nosiča a iných prídavných látok: vplyv na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo retenciu testovanej látky; vplyv na chemické vlastnosti testovanej látky, ktorý môže meniť jej toxické vlastnosti; a vplyv na spotrebu potravy a vody alebo nutričný stav zvierat.

1.4.4. **Limitný test**

Ak v orálnej štúdii s jednou dávkou s veľkosťou minimálne 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň alebo pri podávaní v krmive alebo pitnej vode rovnaký percentuálny podiel v krmive alebo pitnej vode s použitím postupov opísaných pre túto štúdiu nespôsobí žiadne pozorovateľné toxické účinky ani u rodičov, ani u ich potomstva a ak sa toxicita neočakáva na základe údajov zo štrukturálne a/alebo metabolicky príbuzných látok, potom sa môže upustiť od úplnej štúdie s použitím viacerých veľkostí dávok. Limitný test sa uplatňuje s výnimkou prípadu, keď z expozície ľudí vyplýva, že je potrebné použiť vyššiu orálnu dávku. Pre iné typy podávania, ako je napr. inhalácia alebo dermálna aplikácia z fyzikálno-chemických vlastností testovanej látky, ako je napr. rozpustnosť, často môže vyplývať a byť limitovaná maximálna prípustná úroveň expozície.

1.4.5. **Podávanie dávok**

Zvieratám sa podáva testovaná dávka 7 dní v týždni. Uprednostňuje sa orálna cesta podávania (krmivo, pitná voda alebo sonda). Ak sa použije iný spôsob podávania, uvedie sa zdôvodnenie a môžu byť potrebné príslušné úpravy. Všetkým zvieratám sa podáva látka rovnakým spôsobom počas príslušného obdobia pokusu. Ak sa testovaná látka podáva sondou, je potrebné použiť žalúdočnú sondu. Objem kvapaliny podanej jednorázovo nesmie byť vyšší ako 1 ml/100 g telesnej hmotnosti (0,4 ml/100 g telesnej hmotnosti je maximum pre kukuričný olej), s výnimkou vodných roztokov, keď sa môže použiť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. S výnimkou dráždivých alebo žieravých látok, ktoré zvyčajne pri vyšších koncentráciách spôsobia zhoršenie účinkov, variabilita v aplikovanom objeme sa minimalizuje tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem vo všetkých dávkach. V štúdiách, pri ktorých sa používa sonda, mláďatá zvyčajne dostávajú testovanú látku iba nepriamo v mlieku, pokiaľ sa im po odstavení nezačne látka podávať priamo. V štúdiách, pri ktorých sa látka podáva v krmive alebo pitnej vode, mláďatá dostanú dodatočne testovanú látku priamo, keď začnú jesť samostatne počas posledného obdobia laktácie.

▼B

Pre látky podávané v potrave alebo pitnej vode je dôležité zabezpečiť, aby množstvá použitej testovanej látky neinterferovalo s normálnou výživovou a vodnou bilanciou. Keď sa testovaná látka podáva v krmive môže sa použiť buď stála koncentrácia v krmive (ppm) alebo stála veľkosť dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa; použitá alternatíva sa musí špecifikovať. V prípade, keď sa látka podáva sondou, látka sa podáva približne v rovnaký čas každý deň a prispôsobí sa aspoň raz za týždeň, aby sa zachovala stála veľkosť dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť. Informácie, ktoré sa týkajú placentárnej distribúcie, sa posudzujú pri prispôsobení veľkosti dávky cez sondu založenej na hmotnosti.

1.4.6. **Priebeh pokusu**

Denné podávanie testovanej látky samčej a samičej rodičovskej generácii (P) sa začína, keď sú vo veku 5 až 9 týždňov. Denné podávanie testovanej látky F_1 generácii samcov a samíc sa začína po odstavení; je potrebné pamätať na to, že v prípade, keď sa testovaná látka podáva v krmive alebo pitnej vode, priama expozícia F_1 mláďat testovanou látkou sa môže vyskytnúť už počas laktačného obdobia. Pre obidve pohlavia (P a F_1) pokračuje podávanie látky minimálne 10 týždňov pred obdobím párenia. Podávanie látky pokračuje u oboch pohlaví počas 2-týždňového obdobia párenia. Samce sa humánnym spôsobom usmrtia a vyšetria, ak už nie sú potrebné na hodnotenie účinkov na reprodukciu. Rodičovskej generácii samíc (P) pokračuje podávanie látky počas gravidity a až do odstavenia F_1 potomstva. Je potrebné venovať pozornosť úpravám harmonogramu dávkovania založeným na dostupných informáciách o testovanej látke vrátane existujúcich údajov o toxicite, vplyve na metabolizmus alebo bioakumulácii. Dávka pre jednotlivé zviera sa zvyčajne zakladá na naposledy zistenej telesnej hmotnosti. Je však potrebné venovať pozornosť pri nastavovaní dávky počas posledného trimestra gravidity.

Ošetrovanie samcov a samíc generácie P a F_1 pokračuje až do ukončenia. Všetky dospelé samce a samice generácie P a F_1 sa humánnym spôsobom usmrtia, ak už viac nie sú potrebné na hodnotenie účinkov na reprodukciu. Potomstvo generácie F_1, ktoré sa nevyberie na párenie, a celé potomstvo generácie F_2 sa po odstavení humánnym spôsobom usmrtí.

1.4.7. **Párenie**

1.4.7.1. *Párenie rodičov (P)*

V prípade každého párenia sa umiestni každá samica s jedným samcom z rovnakej dávkovej skupiny (párenie 1:1), pokiaľ sa neuskutoční kopulácia, alebo neuplynú 2 týždne. Každý deň sa samice vyšetria na prítomnosť spermy alebo vaginálnej zátky. Za 0. deň gravidity sa určí deň, kedy sa zistil výskyt vaginálnej zátky alebo spermy. V prípade neúspešného párenia sa zváži opätovné párenie samíc so samcami z rovnakej skupiny s preukázanou plodnosťou. Vzájomne spárené páry sa v údajoch zreteľne identifikujú. Je potrebné zabrániť páreniu súrodencov.

▼B

1.4.7.2. *Párenie F_1 generácie*

Pre párenie F_1 potomstva sa z každého vrhu po odstavení vyberie aspoň jeden samec a jedna samica na párenie s mláďatami tej istej dávkovej skupiny, ale z iného vrhu, aby sa vytvorila F_2 generácia. Výber mláďat z každého vrhu je náhodný, ak sa nezistili žiadne významné odlišnosti telesnej hmotnosti alebo vzhľade zvierat z vrhu. V prípade, že sa zistia tieto odlišnosti, vyberú sa najlepší zástupcovia z každého vrhu. Prakticky je to najlepšie na základe telesnej hmotnosti, ale môže to byť vhodnejšie na základe vzhľadu. F_1 potomstvo by sa nemalo pariť, pokiaľ nedosiahne úplnú pohlavnú zrelosť.

Páry bez potomstva sa vyšetria, aby sa určila zjavná príčina neplodnosti. Toto môže zahrnovať také postupy, ako napr. ďalšie možnosti pariť sa s inými samcami alebo samicami s preukázanou plodnosťou, mikroskopické vyšetrenie reprodukčných orgánov a vyšetrenie estrálnych cyklov alebo spermatogenézy.

1.4.7.3. *Druhé párenie*

V určitých prípadoch, ako napr. zmeny vo veľkosti vrhu súvisiace s ošetrením alebo zistenie nejednoznačného účinku pri prvom párení, sa odporúča, aby sa dospelé zvieratá P alebo F_1 generácie opätovne spárili na vytvorenie druhého vrhu. Odporúča sa opätovné spárenie samíc alebo samcov, ktoré nevytvorili vrh so zvieratami opačného pohlavia s preukázanou plodnosťou. Ak sa pokladá za potrebné, aby sa uskutočnil druhý vrh v ktorejkoľvek generácii, zvieratá sa opätovne spária jeden týždeň po odstavení posledného vrhu.

1.4.7.4. *Veľkosť vrhu*

Zvieratám sa umožní, aby vrhli prirodzeným spôsobom a vychovávali svoje potomstvo až do odstavenia. Štandardizácia veľkostí vrhu je nepovinná. Ak sa uskutoční štandardizácia, použitá metóda sa detailne popíše.

1.5. POZOROVANIA

1.5.1. **Klinické vyšetrenia**

Všeobecné klinické vyšetrenie sa uskutoční každý deň a v prípade podávania dávok cez sondu je potrebné, aby načasovanie zohľadnilo predpokladané maximálne účinky po podaní dávky. Zmeny v správaní, príznaky ťažkého alebo dlhotrvajúceho pôrodu a všetky príznaky toxicity sa zaznamenajú. Ďalšie podrobnejšie vyšetrenie každého zvieraťa sa uskutoční aspoň raz do týždňa a môže sa to zvyčajne urobiť počas váženia zvieraťa. Dvakrát za deň, počas víkendu raz za deň sa v prípade potreby u všetkých zvierat zisťuje morbidita a mortalita.

▼B

1.5.2. **Telesná hmotnosť a spotreba potravy/vody rodičovských zvierat**

Rodičovské zvieratá (P a F_1) sa odvážia v prvý deň po podaní látky a potom aspoň raz za týždeň. Rodičovské samice (P a F_1) sa odvážia minimálne v dňoch gravidity 0, 7, 14 a 20 alebo 21 a počas laktácie v rovnaké dni ako sa vážia mláďatá z vrhov a v deň, keď sa zvieratá usmrtia. Tieto zistenia sa zaznamenajú jednotlivo pre každé dospelé zviera. V čase pred obdobím párenia a graviditou sa spotreba krmiva meria minimálne raz za týždeň. Spotreba vody sa meria minimálne raz do týždňa, ak sa testovaná látka podáva vo vode.

1.5.3. **Estrálny cyklus**

Dĺžka estrálneho cyklu a normálny priebeh sa zisťuje u samíc P a F_1 generácie vaginálnymi výtermi pred párením a nepovinne počas párenia, pokiaľ sa nepotvrdí spárenie. Pri odbere vaginálnych/cervikálnych buniek je potrebné venovať pozornosť, aby sa neporušila sliznica a následne nevyvolala pseudogravidita (1).

1.5.4. **Parametre spermií**

Pre všetky samce P a F_1 generácie sa po usmrtení zaznamená hmotnosť semenníkov a nadsemenníkov a odloží sa po jednom z každého orgánu na histopatologické vyšetrenie (pozri oddiel 1.5.7, 1.5.8.1). Z časti pozostávajúcej z aspoň desiatich samcov z každej skupiny samcov generácie P a F_1 sa zostávajúce semenníky a nadsemenníky použijú na zistenie počtu spermatidov homogenizačne rezistentných, prípadne zásob spermií z chvostovej časti nadsemenníkov. V prípade tejto istej časti samcov, sa spermie z chvostovej časti nadsemenníkov alebo semenovodu odoberú na vyšetrenie pohyblivosti a morfológie spermií. Ak sa zistia účinky v súvislosti s ošetrením, alebo ak existuje dôkaz z iných štúdií o možných účinkoch na spermatogenézu, hodnotenie spermií sa uskutoční u všetkých samcov v každej dávkovej skupine; v opačnom prípade sa môže výpočet obmedziť na samce P a F_1 generácie z kontrolnej skupiny a skupiny s vysokými dávkami.

Zistí sa celkový počet homogenizačne rezistentných spermatidov a spermií z chvostovej časti nadsemenníkov (2) (3). Zásoby spermií z chvostovej časti nadsemenníkov sa odvodia na základe koncentrácie a objemu spermií v suspenzii použitej na doplnenie kvalitatívnych hodnotení a počtu spermií získaných následným pomletím a/alebo homogenizáciou zvyšného tkaniva chvostovej časti. Počet sa zistí u vybratej podskupiny samcov všetkých dávkových skupín bezprostredne po usmrtení zvierat, pokiaľ sa neurobia video alebo digitálne záznamy, alebo pokiaľ sa vzorky nezamrazia a neanalyzujú neskôr. V týchto prípadoch sa môže ako prvá analyzovať kontrolná skupina a skupina s vysokou dávkou. Ak sa nezistia žiadne účinky v súvislosti s ošetrením (napr. účinky na počet spermií, pohyblivosť alebo morfológiu), ostatné dávkové skupiny nie je potrebné analyzovať. Ak sa zaznamenajú účinky v súvislosti s ošetrením v skupine s vysokými dávkami, potom sa skupiny s nižšími dávkami tiež posúdia.

▼B

Posúdi sa pohyblivosť spermií v nadsemenníkoch (alebo semenovode), alebo sa zaznamená na video pásku bezprostredne po usmrtení. Spermie sa odoberú tak, aby sa minimalizovalo poškodenie a zriedia, aby sa mohla vykonať analýza pohyblivosti s použitím uznaných metód (4). Percento progresívne pohybujúcich sa spermií sa stanoví buď subjektívne alebo objektívne. Ak sa uskutočňuje počítačová analýza pohyblivosti (5) (6) (7) (8) (9) (10), odvodenie progresívnej pohyblivosti sa zakladá na maximálnych hodnotách definovaných užívateľom pre priemernú rýchlosť dráhy a priamosť alebo lineárny index. Ak sa vzorky nahrávajú na videopásky (11), alebo sa obrazy inak zaznamenávajú počas autopsie, môže sa vykonať následná analýza iba kontrolnej skupiny a skupiny s vysokými dávkami samcov generácie P a F_1, pokiaľ sa nezistia účinky v súvislosti s ošetrením; v takomto prípade sa posúdia aj skupiny s nižšími dávkami. Pri neprítomnosti video alebo digitálnych záznamov sa všetky vzorky vo všetkých ošetrovaných skupinách analyzujú pri autopsii.

Uskutoční sa morfologické vyšetrenie spermií zo vzorky z nadsemenníkov (alebo semenovodu). Spermie (minimálne 200 na vzorku) sa vyšetria ako fixné, mokré preparáty (12) a zatriedia sa ako buď normálne alebo abnormálne. Vzorky morfologických abnormalít spermií zahrnujú fúziu, oddelené hlavičky a zdeformované hlavičky a/alebo bičíky. Vyšetrenie sa vykoná na vybratej podskupine samcov všetkých dávkových skupín buď bezprostredne po usmrtení zvierat, alebo neskôr na základe video alebo digitálnych záznamov. Stery po fixovaní sa tiež môžu posúdiť neskôr. V týchto prípadoch sa môže ako prvá analyzovať kontrolná skupina a skupina s vysokou dávkou. Ak sa nepozorujú žiadne účinky v súvislosti s ošetrením (napr. účinky na morfológiu spermií), ostatné dávkové skupiny nie je potrebné analyzovať. Ak sa zaznamenajú účinky v súvislosti s ošetrením v skupine s vysokými dávkami, potom sa skupiny s nižšími dávkami tiež posúdia.

Ak sa horeuvedené parametre hodnotenia spermií už preskúmali ako súčasť štúdie systémovej toxicity o dĺžke aspoň 90 dní, nie je ich potrebné zopakovať v dvojgeneračnej štúdii. Odporúča sa však, aby sa uchovali vzorky alebo digitálne záznamy spermií P generácie na umožnenie neskoršieho posúdenia v prípade potreby.

1.5.5. **Potomstvo**

Každý vrh sa vyšetrí čo najskôr po pôrode (0. deň laktácie), aby sa zistil počet a pohlavie potomstva, mŕtvo narodené a živo narodené jedince a výskyt nápadných anomálií. Mláďatá, ktoré sa našli mŕtve v deň 0, ak nie sú macerované, sa prednostne vyšetria na možné poruchy a príčinu uhynutia a sa zakonzervujú. Živé mláďatá sa spočítajú a každé sa jednotlivo po narodení odváži (0. deň laktácie) alebo na 1. deň a potom pravidelne v deň váženia, napr. na 4., 7., 14. a 21. deň laktácie. Fyzické abnormality a poruchy správania pozorované u matiek alebo potomstva sa zaznamenajú.

▼B

Fyzický vývoj potomstva sa zaznamená najmä na základe prírastku telesnej hmotnosti. Ostatné fyzické parametre (napr. otvorenie očí a uší, prerezanie zubov, rast srsti) môžu poskytnúť doplňujúce informácie, ale tieto údaje sa hodnotia prednostne v súvislosti s údajmi o sexuálnej zrelosti (napr. vek a telesná hmotnosť v čase otvorenia vagíny alebo oddelenia žaluďa a predkožky) (13). Vyšetrenia funkčnosti (napr. motorická aktivita, zmyslové funkcie, reflexná ontogenézia) F_1 potomstva pred a/alebo po odstavení predovšetkým tie, ktoré sa týkajú sexuálnej zrelosti, sa odporúčajú, ak takéto vyšetrenia nie sú zahrnuté v samostatných štúdiách. Vek v čase vaginálneho otvorenia a oddelenia predkožky sa určí pre odstavené zvieratá generácie F_1 vybraté pre párenie. Anogenitálna vzdialenosť sa zmeria v deň 0 po narodení u mláďat generácie F_2, ak sa vyskytnú zmeny v pomere pohlaví u generácie F_1 alebo v čase pohlavnej zrelosti.

Vyšetrenia funkčnosti sa môžu vynechať v skupinách, v ktorých sa iným spôsobom prejavili jasné príznaky nepriaznivých účinkov (napr. významný pokles prírastku hmotnosti atď.). Ak sa uskutočňujú vyšetrenia funkčnosti, neuskutočnia sa na mláďatách vybratých na párenie.

1.5.6. **Autopsia**

V čase usmrtenia alebo uhynutia počas štúdie sa všetky rodičovské zvieratá (P a F_1 generácie), všetky mláďatá s externými abnormalitami alebo klinickými príznakmi, ako aj po jednom náhodne vybratom mláďati/pohlaví/vrhu z F_1 a aj F_2 generácie vyšetria makroskopicky na všetky štrukturálne abnormality alebo patologické zmeny. Osobitná pozornosť sa venuje orgánom reprodukčného systému. Moribundné mláďatá sa humánnym spôsobom usmrtia a uhynuté mláďatá, ak nie sú macerované, sa vyšetria na možné defekty a/alebo príčinu uhynutia a zakonzervujú.

Maternice všetkých samíc, ktoré prvý raz rodili, sa vyšetria spôsobom, ktorý neovplyvní histopatologické vyšetrenie, na výskyt a počet implantačných miest.

1.5.7. **Hmotnosť orgánov**

V čase usmrtenia sa zistí telesná hmotnosť týchto orgánov všetkých rodičovských zvierat P a F_1 generácie (párové orgány sa vážia jednotlivo):

— uterus, vaječníky,

— semenníky, nadsemenníky (celé a chvostová časť),

— prostata,

— semenné vačky s koagulačnými žľazami a ich tekutiny a prostata (ako jedna jednotka),

— mozog, pečeň, obličky, slezina, hypofýza, štítna žľaza a nadobličky a známe cieľové orgány.

Zistia sa konečné telesné hmotnosti mláďat generácie F_1 a F_2 vybratých na autopsiu. U jedného náhodne vybratého mláďaťa/pohlavia/vrhu sa odvážia tieto orgány (pozri časť 1.5.6): mozog, slezina a týmus.

▼B

Výsledky autopsie a hmotnosti orgánov sa posúdia v súvislosti so zisteniami z iných štúdií pri opakovaných dávkach, ak je to možné.

1.5.8. **Histopatológia**

1.5.8.1. *Rodičovské zvieratá*

Tieto orgány a tkanivá rodičovských zvierat (P a F_1) alebo ich reprezentatívne vzorky sa fixujú a uchovajú vo vhodnom médiu na histopatologické vyšetrenie:

— vagína, uterus s cervixom a vaječníky (zakonzervované vo vhodnom fixačnom prostriedku),

— jeden semenník (konzervovaný v Bouinovom roztoku alebo porovnateľnom fixačnom prostriedku), jeden nadsemenník, semenné vačky, prostata a koagulačná žľaza,

— predtým identifikovaný cieľový orgán(-y) zo všetkých zvierat P a F_1 generácie vybratých na párenie.

Úplné histopatologické vyšetrenie zakonzervovaných hore uvedených orgánov a tkanív sa uskutoční u všetkých zvierat zo skupiny s vysokými dávkami a z kontrolnej skupiny generácie P a F_1 vybratých na párenie. Vyšetrenie vaječníkov zvierat P generácie je nepovinné. Orgány vykazujúce zmeny v súvislosti s ošetrením sa tiež vyšetria v skupinách s nízkymi a strednými dávkami na pomoc pri stanovení NOAEL. Ďalej sa podrobia histopatologickému vyšetreniu reprodukčné orgány zvierat zo skupín s nízkymi a strednými dávkami s podozrením na zníženú fertilitu, napr. tie, ktoré zlyhali pri párení, počatí, plodení alebo vrhnutí zdravého potomstva, alebo u ktorých bol ovplyvnený estrálny cyklus alebo počet spermií, pohyblivosť alebo morfológia. Všetky makroskopické lézie ako napr. atrofia alebo tumory sa vyšetria.

Semenníky sa podrobne histopatologicky vyšetria (napr. s použitím Bouinovho fixačného prostriedku, zaliatia v parafíne a transverzálnych rezov s hrúbkou 4 – 5 um) na identifikáciu účinkov, ktoré boli spôsobené v súvislosti s ošetrením, ako sú napr. retencia spermatidov, chýbajúce vrstvy zárodočných buniek alebo typy, mnohojadrové obrovské bunky alebo olupovanie spermatogénnych buniek do lumenu (14). Vyšetrenie intaktných nadsemenníkov zahrnuje hlavu, telo a chvostovú časť, ktoré sa môže vykonať na základe posúdenia pozdĺžneho rezu. Nadsemenníky sa vyšetria na infiltráciu leukocytov, zmenu prevalencie typov buniek, aberantných typov buniek a fagocytózu spermií. PAS a farbenie hematoxylínom sa môže použiť na vyšetrenie samčích reprodukčných orgánov.

Vaječník po odstavení má obsahovať primordiálne a rastúce folikuly, ako aj veľké žlté teliesko obdobia laktácie. Histopatologickým vyšetrením sa má zistiť kvalitatívny úbytok primordiálnych folikúl. Kvantitatívne hodnotenie primordiálnych folikúl sa uskutoční pre samice F1 generácie; počet zvierat, výber rezu vaječníkov a výber veľkosti vzoriek má byť štatisticky primeraný na posúdenie použitej metódy. Do vyšetrenia sa zahrnie stanovenie počtu primordiálnych folikúl, ktoré sa môžu kombinovať s malými rastúcimi folikulami na porovnanie ošetrených a kontrolných vaječníkov (15) (16) (17) (18) (19).

▼B

1.5.8.2. *Odstavené zvieratá*

Makroskopicky abnormálne tkanivo a cieľové orgány zo všetkých mláďat s vonkajšími abnormalitami alebo klinickými príznakmi, ako aj na jednom z náhodne vybratom mláďati/pohlaví/vrhu z oboch generácií F_1 a F_2, ktoré neboli vybraté na párenie, sa zafixuje a uchová vo vhodnom médiu na histopatologické vyšetrenie. Úplná histopatologická charakterizácia zakonzervovaného tkaniva sa uskutoční s osobitným dôrazom na orgány reprodukčného systému.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje sa zaprotokolujú jednotlivo a zosumarizujú vo forme tabuliek a uvedie sa pre každú pokusnú skupinu a každú generáciu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu, alebo sa usmrtili z humánnych dôvodov, čas každého úmrtia alebo humánneho usmrtenia, počet fertilných samíc, počet gravidných samíc, počet zvierat vykazujúcich príznaky toxicity, popis zistených príznakov toxicity, vrátane času nástupu, trvania a závažnosti každého toxického účinku, typy vyšetrení rodičov a potomstva, typy histopatologických zmien a všetky údaje, ktoré sa týkajú vrhu.

Číselné výsledky sa vyhodnotia príslušnou všeobecne uznávanou štatistickou metódou; ako súčasť plánu štúdie by sa mali zvoliť štatistické metódy, ktoré by sa mali zdôvodniť. Na analýzu údajov môžu byť užitočné štatistické modely reakcie na podanie dávky. Správa by mala obsahovať dostatok informácií o analytickej metóde a použitom počítačovom programe, aby nezávislý kontrolór/štatistik mohol prehodnotiť a zrekonštruovať analýzu.

2.2. VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Zistenia z tejto štúdie dvojgeneračnej reprodukčnej toxicity by sa mali vyhodnotiť na základe zistených účinkov vrátane autopsie a mikroskopických nálezov. Hodnotenie bude zahrnovať vzťah alebo jeho absenciu medzi dávkou testovanej látky a prítomnosť alebo absenciu výskytu a závažnosti abnormalít, vrátane makroskopických lézií, identifikovaných cieľových orgánov, ovplyvnenej fertility, klinických abnormalít, ovplyvnenej reprodukčnej činnosti a schopnosti vrhnúť, zmien telesnej hmotnosti, účinkov na mortalitu a iných toxických účinkov. Pri hodnotení výsledkov testu by sa mali zohľadniť fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej látky a, ak sú dostupné, toxikokinetické údaje.

Riadne vykonaný test reprodukčnej toxicity by mal poskytnúť uspokojivé stanovenie hladiny, ktorá nevyvoláva účinky, a umožniť pochopenie nepriaznivých účinkov na reprodukciu, pôrod, laktáciu, postnatálny vývoj vrátane rastu a sexuálneho vývoja.

▼B

2.3. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Štúdia dvojgeneračnej reprodukčnej toxicity poskytne informácie o účinkoch opakovanej expozície látkou počas všetkých fáz reprodukčného cyklu. Štúdia poskytuje informácie predovšetkým o reprodukčných parametroch a o vývoji, raste, dozrievaní a prežívaní potomstva. Výsledky štúdie by sa mali interpretovať v spojitosti so zisteniami zo subchronických štúdií, štúdií prenatálneho vývoja, toxikokinetických a iných dostupných štúdií. Výsledky tejto štúdie sa môžu použiť pri posudzovaní potreby ďalšieho testovania chemikálie. Extrapolácia výsledkov štúdie na človeka platí len obmedzene. Najlepšie slúžia na poskytnutie informácií o NOAEL a prípustnej expozície ľudí (20) (21) (22) (23).

3. **PODÁVANIE SPRAV**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje,

— čistota.

Nosič (v prípade potreby):

— zdôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda.

Pokusné zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo, hniezdiaci materiál atď.,

— hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku testu.

Podmienky testu:

— zdôvodnenie výberu veľkosti dávok;

— údaje o príprave zloženia testovanej látky/krmiva, dosiahnutých koncentráciách;

— stabilita a homogenita prípravku,

— údaje o podávaní testovanej látky,

— prepočet koncentrácie testovanej látky v krmive/pitnej vode (ppm) na dosiahnutú dávku (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), ak je potrebné,

— údaje o kvalite krmiva a vody.

▼B

Výsledky:

— spotreba potravy a spotreba vody, ak sú k dispozícii, účinnosť krmiva (prírastok telesnej hmotnosti na gram skonzumovanej potravy) a spotreba testovaného materiálu pre zvieratá generácie P a F_1, okrem obdobia párenia a aspoň posledných troch mesiacov laktácie,

— údaje o absorpcii (ak sú k dispozícii),

— údaje o telesnej hmotnosti zvierat P a F_1 generácie vybratých na párenie,

— údaje o hmotnosti vrhu a mláďat,

— telesná hmotnosť pri usmrtení a údaje o absolútnych a relatívnych hmotnostiach orgánov rodičov,

— povaha, závažnosť a trvanie klinických vyšetrení (s údajmi o reverzibilite),

— čas uhynutia počas štúdie, alebo či zvieratá prežili do usmrtenia,

— údaje o toxickej reakcii podľa pohlavia a dávky, vrátane indexov pre párenie, fertilitu, graviditu, pôrod, životaschopnosť a laktáciu; v správe je potrebné uviesť čísla použité na výpočet týchto indexov,

— toxické alebo iné účinky na reprodukciu, potomstvo, postnatálny rast atď.,

— nálezy z autopsie,

— podrobný popis všetkých histopatologických nálezov,

— počet samíc generácie P a F_1 s normálnym cyklom a trvanie cyklu,

— celkový počet spermií z chvostovej časti nadsemenníkov, percento progresívne sa pohybujúcich spermií, percento morfologicky normálnych spermií a percento spermií s každou identifikovanou abnormalitou,

— čas do inseminácie, vrátane počtu dní do inseminácie,

— dĺžka gravidity,

— počet implantátov, žlté telieska (corpora lutea), veľkosť vrhu,

— počet živo narodených zvierat a straty po implantácii,

— počet mláďat s makroskopicky viditeľnými abnormalitami, ak je zistený počet nevyvinutých jedincov je potrebné uviesť,

— údaje o fyzických medzníkoch vo vývoji mláďat a iné postnatálne údaje o vývoji; hodnotené fyzické medzníky sa zdôvodnia,

— údaje o vyšetreniach funkčnosti u mláďat a dospelých, ak je možné,

— štatistické spracovanie výsledkov v prípade potreby.

▼B

Diskusia k výsledkom.

Závery, vrátane hodnôt NOAEL pre matku a potomstvo.

4. **ODKAZY**

(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: 39–44.

(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, pp. 319–333.

(10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10: 401–415.

(11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8: 330–337.

(12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6: 491–505.

(13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17: 298–303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421–426.

(17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, B.J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5: 379–383.

(19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston,. and 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 CD. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

(21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

(22) Palmer, A.K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

(23) 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. **TOXIKOKINETIKA**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s OECD TG 417 (2010). Štúdie skúmajúce toxikokinetiku (TK) testovanej chemikálie sa vykonávajú s cieľom získať primerané informácie o jej absorpcii, distribúcii, biotransformácii (t. j. metabolizme) a exkrécii, aby bolo možné ľahšie priradiť koncentráciu alebo dávku k pozorovanej toxicite a lepšie pochopiť jej mechanizmus toxicity. TK môže pomôcť porozumieť toxikologickým štúdiám tak, že preukáže, že pokusné zvieratá sú systémovo vystavené účinkom testovanej chemikálie, a zistí cirkulujúce podiely (materská chemikália/metabolity). Základné TK parametre určené na základe týchto štúdií poskytnú aj informácie o potenciáli akumulácie testovanej chemikálie v tkanivách a/alebo v orgánoch a o potenciáli indukcie biotransformácie ako dôsledku expozície testovanej chemikálii.

2. TK údaje môžu pomôcť pri hodnotení vhodnosti a významnosti údajov o toxicite pri zvieratách na účely extrapolácie hodnotenia nebezpečnosti a/alebo rizík pre človeka. Okrem toho toxikokinetické štúdie môžu priniesť užitočné informácie na stanovenie úrovní dávok pre štúdie toxicity (lineárna alebo nelineárna kinetika), zistenie účinkov spôsobu podávania, biodostupnosti a otázok spojených s prípravou štúdie. Niektoré druhy TK údajov možno použiť pri vývoji fyziologicky založených toxikokinetických (PBTK) modelov.

3. Dôležité využitie údajov o metabolitoch/TK údajov predstavuje napríklad predpovedanie možnej toxicity a druhu pôsobenia a ich vzťahu k úrovni dávky a spôsobu expozície. Okrem toho môžu údaje o metabolizme poskytnúť informácie, ktoré sú užitočné pri hodnotení toxikologického významu expozície pre exogénne vytvárané metabolity testovanej chemikálie.

4. Vhodné toxikokinetické údaje sú užitočné pri zabezpečovaní ďalšej prijateľnosti a použiteľnosti kvantitatívnych vzťahov štruktúry a aktivity, krížových alebo skupinových prístupov pri hodnotení bezpečnosti chemikálií. Kinetické údaje sa môžu využiť aj pri hodnotení toxikologickej významnosti iných štúdií (napr. *in vivo*/*in vitro*).

5. Pokiaľ sa neuvádza iný spôsob podávania (pozri najmä odseky 74 – 78), táto testovacia metóda sa používa v prípade orálneho podávania testovanej chemikálie.

ÚVODNÉ ÚVAHY

6. Regulačné systémy majú na rôzne triedy chemikálií (napr. pesticídy, biocídy, priemyselné chemikálie) rôzne požiadavky a potreby týkajúce sa merania ukazovateľov a parametrov súvisiacich s toxikokinetikou. Na rozdiel od väčšiny testovacích metód je v tejto testovacej metóde opísané testovanie toxikokinetiky, ktoré zahŕňa viacero meraní a parametrov. V budúcnosti môžu byť vypracované nové testovacie metódy a/alebo usmerňovacie dokumenty, ktoré budú opisovať každý parameter samostatne a podrobnejšie. V prípade tejto testovacej metódy závisí otázka, ktoré testy alebo hodnotenia sa vykonávajú, od požiadaviek a/alebo potrieb jednotlivých regulačných systémov.

▼M4

7. Existuje mnoho štúdií, ktoré sa môžu vykonať na regulačné účely s cieľom posúdiť TK správanie testovanej chemikálie. V závislosti od konkrétnych regulačných potrieb alebo situácií však nemusia byť všetky tieto štúdie na posúdenie testovanej chemikálie nutné. Pri príprave toxikokinetických štúdií je potrebná flexibilita, pričom sa zohľadnia charakteristiky skúmanej testovanej chemikálie. V niektorých prípadoch môže byť na zistenie nebezpečnosti a rizík spojených s testovanou chemikáliou potrebné preskúmať iba určitý súbor otázok. V určitých situáciách možno údaje TK zozbierať v rámci hodnotenia v iných toxikologických štúdiách. V iných situáciách môžu byť potrebné ďalšie a/alebo rozsiahlejšie TK štúdie v závislosti od regulačných potrieb a/alebo v prípade, že sa v rámci hodnotenia testovanej chemikálie objavia nové otázky.

8. Pred samotným vykonaním štúdie testovacie laboratórium zváži všetky dostupné informácie o testovanej chemikálii, relevantných metabolitoch a analógoch s cieľom zlepšiť kvalitu štúdie a predísť zbytočnému využívaniu zvierat. Toto zváženie sa môže týkať údajov získaných pomocou iných relevantných testovacích metód (štúdie *in vivo*, štúdie *in vitro* a/alebo hodnotenia *in silico*). Fyzikálno-chemické vlastnosti, ako je napríklad rozdeľovací koeficient oktanol – voda (vyjadrený ako log P_{ow}), pKa, rozpustnosť vo vode, tlak pary a molekulová hmotnosť chemikálie, môžu byť užitočné pri plánovaní štúdie a interpretácii výsledkov. Možno ich stanoviť pomocou vhodných metód, ktoré sú opísané v príslušných testovacích metódach.

OBMEDZENIA

9. Táto testovacia metóda nie je určená pre prípad osobitných okolností, ako sú gravidné zvieratá alebo zvieratá v laktácii a mláďatá, ani na hodnotenie potenciálnych rezíduí pri exponovaných zvieratách určených na produkciu potravín. Údaje získané pomocou štúdie B.36 však môžu poskytnúť základné informácie na plánovanie konkrétnych štúdií na účely takéhoto vyšetrovania. Táto testovacia metóda nie je určená na testovanie nanomateriálov. Zo správy o predbežnej revízii usmernení OECD na vykonávanie testov, pokiaľ ide o ich použiteľnosť v prípade nanomateriálov, vyplýva, že usmernenia TG 417 (rovnocenné s touto testovacou metódou B.36) nie je možné použiť v prípade nanomateriálov (1).

VYMEDZENIE POJMOV

10. Vymedzenie pojmov použitých na účely tejto testovacej metódy je uvedené v dodatku.

OTÁZKA DOBRÝCH ŽIVOTNÝCH PODMIENOK ZVIERAT

11. Usmernenia o humánnom zaobchádzaní so zvieratami sú k dispozícii v usmerňovacom dokumente OECD (GD) č. 19 (2). Odporúča sa preštudovať si dokument OECD GD 19 v prípade všetkých štúdií *in vivo* a *in vitro* opísaných v rámci tejto testovacej metódy.

OPIS METÓD

Pilotné štúdie

12. Pri výbere experimentálnych parametrov pre štúdie toxikokinetiky (napr. metabolizmus, hmotnostná bilancia, analytické postupy, stanovenie dávok, exhalácia CO_2 atď.) sa dôrazne odporúča použitie pilotných štúdií. Na charakterizáciu niektorých týchto parametrov nemusí byť potrebné použitie rádiooznačených chemikálií.

▼M4

Výber zvierat

Druh

13. Druh (a kmeň) zvierat použitých na TK testovanie by podľa možnosti mal byť rovnaký ako druh (a kmeň) použitý v ostatných toxikologických štúdiách vykonaných s použitím skúmanej testovanej chemikálie. Zvyčajne sa používa potkan, lebo tento druh sa pri toxikologických štúdiách využíva vo veľkej miere. Iné alebo ďalšie druhy sa môžu použiť, ak kritické toxikologické štúdie pri týchto druhoch preukazujú významnú toxicitu alebo ak sa preukáže, že ich toxicita/toxikokinetika má väčší význam pre ľudí. Výber druhu a kmeňa zvierat je potrebné odôvodniť.

14. Pokiaľ nie je uvedené inak, v tejto testovacej metóde je testovaným živočíšnym druhom potkan. Určité aspekty metódy sa možno v prípade použitia iného testovacieho druhu budú musieť pozmeniť.

Vek a kmeň

15. Použijú sa mladé zdravé dospelé zvieratá (zvyčajne vo veku 6 – 12 týždňov v čase dávkovania) (pozri aj odseky 13 a 14). Použitie zvierat, ktoré nie sú mladé a dospelé jedince, je potrebné odôvodniť. Všetky zvieratá by mali mať na začiatku štúdie približne rovnaký vek. Variácia hmotnosti jednotlivých zvierat by nemala presiahnuť ± 20 % strednej hmotnosti v testovacej skupine. Podľa možnosti by použitý kmeň mal byť rovnaký ako kmeň použitý pri tvorbe toxikologickej databázy pre testovanú chemikáliu.

Počet a pohlavie zvierat

16. Pri každej testovanej dávke sa použijú najmenej štyri zvieratá z jedného pohlavia. Výber pohlavia použitých zvierat je potrebné odôvodniť. Použitie oboch pohlaví (štyri samce a štyri samice) sa zváži, ak existujú dôkazy svedčiace o významných rozdieloch v toxicite, ktoré súvisia s pohlavím.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

17. Zvieratá sú počas obdobia testovania zvyčajne umiestnené samostatne. Za osobitných okolností môže byť opodstatnené umiestnenie v skupinách. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Teplota miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C (± 3 °C) a relatívna vlhkosť by mala byť 30 – 70 %. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

Testovaná chemikália

18. V prípade aspektov štúdie súvisiacich s hmotnostnou bilanciou a identifikáciou metabolitov sa použije testovaná chemikália rádiooznačená pomocou ^{14}C. Ak však možno preukázať, že:

— hmotnostnú bilanciu a identifikáciu metabolitov možno primerane posúdiť pomocou neoznačenej testovanej chemikálie,

— analytická špecifickosť a citlivosť použitej metódy s využitím nerádioaktívnej testovanej chemikálie je rovnaká alebo väčšia ako analytická špecifickosť a citlivosť, ktorú možno získať pomocou rádiooznačenej testovanej chemikálie,

▼M4

potom sa nemusí použiť rádiooznačená testovaná chemikália. Okrem toho možno použiť iné rádioaktívne a stabilné izotopy, najmä ak daný prvok vyvoláva alebo prispieva k toxickej zložke testovanej chemikálie. Ak je to možné, rádiooznačenie by sa malo nachádzať v ústrednej časti molekuly, ktorá je metabolicky stabilná (nie je zameniteľná, neodstráni sa metabolicky ako CO_2 a nestane sa súčasťou jednouhlíkového lôžka organizmu). Označenie viacerých miest alebo špecifických oblastí molekuly môže byť potrebné pri sledovaní metabolickej premeny testovanej chemikálie.

19. Rádiooznačené testované chemikálie a testované chemikálie, ktoré nie sú rádiooznačené, sa analyzujú pomocou vhodných metód na určenie ich čistoty a identity. Rádiočistota rádioaktívnej testovanej chemikálie by mala byť najvyššia, ktorú možno pri danej testovanej chemikálii dosiahnuť (v ideálnom prípade by mala byť vyššia ako 95 %), pričom by sa malo vynaložiť primerané úsilie na identifikáciu prímesí tvoriacich 2 % alebo viac. Čistota spolu s identitou a podielom všetkých prímesí, ktoré boli identifikované, sa uvedú v správe. V rámci jednotlivých regulačných programov môžu byť k dispozícii ďalšie usmernenia na uľahčenie vymedzenia a špecifikácií testovaných chemikálií zložených zo zmesí a metódy na určenie čistoty.

Výber dávky

Pilotná štúdia

20. Zvyčajne na účely pilotnej štúdie postačuje jednorazová orálna dávka. Dávka by mala byť netoxická, ale dostatočne vysoká, aby umožnila identifikáciu metabolitov v exkrétoch (a v plazme, ak je to vhodné), ako aj splnenie stanoveného účelu pilotnej štúdie, ako sa uvádza v odseku 12 tejto testovacej metódy.

Základné štúdie

21. V prípade základných štúdií sa uprednostňujú minimálne dve dávky, lebo informácie získané pomocou najmenej dvoch skupín s dávkou môžu byť užitočné pri stanovení dávky v ďalších štúdiách toxicity a pri hodnotení vzťahu dávky a reakcie v rámci testov toxicity, ktoré sú už k dispozícii.

22. Ak sa podajú dve dávky, obidve dávky by mali byť dostatočne vysoké, aby bolo možné identifikovať metabolity v exkrétoch (a v plazme, ak je to vhodné). Pri výbere dávok treba zvážiť informácie získané z dostupných údajov o toxicite. Ak takéto informácie nie sú k dispozícii (napr. zo štúdií akútnej orálnej toxicity s údajmi o klinických príznakoch toxicity alebo zo štúdií toxicity v opakovaných dávkach), možno zvážiť použitie takej hodnoty vyššej dávky, ktorá je nižšia ako odhadovaná dávka LD_{50} (orálny a dermálny spôsob podávania) alebo odhadovaná koncentrácia LC_{50} (inhalačný spôsob podávania) alebo ktorá je pod úrovňou nižšej hodnoty odhadu rozsahu akútnej toxicity. Nižšia dávka by mala byť zlomkom vyššej dávky.

23. Ak sa skúma iba jedna úroveň dávky, podľa možnosti by dávka mala byť dostatočne vysoká, aby bolo možné identifikovať metabolity v exkrétoch (a v plazme, ak je to vhodné), ale súčasne by nemala viesť k zjavnej toxicite. Nepoužitie druhej úrovne dávky je potrebné odôvodniť.

24. Ak je potrebné zistiť účinok dávky na kinetické procesy, dve dávky nemusia postačovať a aspoň jedna dávka by mala byť dostatočne vysoká na nasýtenie týchto procesov. Ak plocha pod krivkou závislosti koncentrácie a času (AUC) medzi dvoma úrovňami dávky použitými v základnej štúdii nie je lineárna, je zrejmé, že k nasýteniu jedného alebo dvoch kinetických procesov dochádza niekde medzi týmito dvomi úrovňami dávky.

▼M4

25. V prípade testovaných chemikálií s nízkou toxicitou sa použije maximálna dávka na úrovni 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti (orálny a dermálny spôsob podávania) (usmernenia pre inhalačný spôsob podávania sú k dispozícii v kapitole B.2 tejto prílohy; táto dávka zvyčajne nepresahuje 2 mg/l). V rámci úvah týkajúcich sa chemikálie môže byť v závislosti od regulačných potrieb potrebná vyššia dávka. Výber dávky treba vždy odôvodniť.

26. Na stanovenie potenciálu akumulácie a/alebo perzistencie môžu byť vhodné toxikokinetické údaje a údaje o rozdelení tkanív týkajúce sa jednorazovej dávky. Za určitých okolností však môže byť nutné podanie v opakovaných dávkach i) na účely komplexnejšieho stanovenia potenciálu akumulácie a/alebo perzistencie alebo zmien v TK (t. j. napríklad enzýmovej indukcie a inhibície) alebo ii) na základe požiadaviek príslušného regulačného systému. Hoci v štúdiách v opakovaných dávkach väčšinou postačuje opakované podanie nízkej dávky, za určitých okolností môže byť nutné aj opakované podanie vysokej dávky (pozri odsek 57).

Podávanie testovanej chemikálie

27. Testovaná chemikália sa rozpustí alebo homogénne suspenduje v rovnakom nosiči, aký bol použitý v štúdiách orálnej toxicity pri podávaní danej testovanej chemikálie cez sondu, ak sú tieto informácie o nosiči k dispozícii. Výber nosiča je potrebné odôvodniť. Výber nosiča a objemu dávkovania by sa mal zvážiť v pláne štúdie. Chemikália sa zvyčajne podáva cez sondu. Podávanie formou želatínových kapsúl alebo ako zmes krmiva však môže mať v určitých situáciách výhody (v oboch prípadoch je potrebné uviesť odôvodnenie). Treba overiť, či bola každému zvieraťu podaná skutočná dávka.

28. Maximálny objem tekutiny, ktorá sa jednorazovo podá cez orálnu sondu, závisí od veľkosti testovacích zvierat, druhu nosiča dávky a od skutočnosti, či sa pred podaním testovanej chemikálie zviera kŕmilo alebo nie. Podávanie alebo obmedzenie krmiva pred dávkovaním je potrebné odôvodniť. Objem by za bežných okolností mal byť podľa možnosti čo najnižší v prípade vodných, ako aj v prípade bezvodých nosičov. Objemy dávok by v prípade hlodavcov normálne nemal presahovať 10 ml/kg telesnej hmotnosti. Objemy nosičov použitých v prípade lipofilnejších testovaných chemikálií sa môžu začínať na úrovni 4 ml/kg telesnej hmotnosti. V prípade opakovaných dávok, keď je kontraindikovaný denný pôst, je potrebné zvážiť nižšie objemy dávok (napr. 2 – 4 ml/kg telesnej hmotnosti). Podľa možnosti by sa malo zvážiť použitie takého objemu dávky, ktorý je konzistentný s objemom použitým v iných štúdiách orálnej toxicity testovanej chemikálie pri podávaní cez sondu.

29. Intravenózne (IV) podávanie testovanej chemikálie a meranie testovanej chemikálie v krvi a/alebo v exkrétoch možno použiť na stanovenie biodostupnosti alebo relatívnej orálnej absorpcie. V prípade IV štúdie sa pomocou vhodného nosiča podá jedna dávka (zvyčajne rovnaká, ale nie vyššia ako nižšia orálna dávka – pozri výber dávky) testovanej chemikálie. Tento materiál sa vo vhodnom objeme (napr. 1 ml/kg telesnej hmotnosti) aplikuje na vybraté miesto najmenej štyrom zvieratám príslušného pohlavia (ak je to opodstatnené, možno použiť obidve pohlavia, pozri odsek 16). Pri IV podávaní testovanej chemikálie je potrebná príprava úplne rozpustenej alebo suspendovanej dávky. Nosič by pri IV podávaní nemal interferovať s integritou krvi alebo s prietokom krvi. Ak sa testovaná chemikália podáva

▼M4

infúzne, dávka podaná infúziou by sa mala uviesť v správe a medzi jednotlivými zvieratami by mala byť štandardizovaná, za predpokladu, že sa použije infúzna pumpa. Kanylovanie hrdelnej žily (na podanie testovanej chemikálie a/alebo na odber krvi) alebo podanie cez femorálnu artériu sa vykonáva v anestézii. Druh anestézie treba dôkladne zvážiť, lebo môže ovplyvniť toxikokinetiku. Zvieratám by sa pred podaním testovanej chemikálie s nosičom malo umožniť, aby sa dostatočne zotavili.

30. Iné spôsoby podávania, ako je dermálne alebo inhalačné podávanie (pozri odseky 74 – 78), možno použiť v prípade určitých testovaných chemikálií po zvážení ich fyzikálno-chemických vlastností a predpokladaného použitia a expozície u ľudí.

Merania

Hmotnostná bilancia

31. Hmotnostná bilancia sa stanoví sčítaním percenta podanej (rádioaktívnej) dávky vylúčenej v moči, výkaloch a vydychovanom vzduchu a percenta prítomného v tkanivách, zostávajúcich častiach mŕtveho tela a zvyškoch v klietke (pozri odsek 46). Vo všeobecnosti sa celková výťažnosť podanej testovanej chemikálie (rádioaktivita) v rozsahu > 90 % považuje za primeranú.

Absorpcia

32. Počiatočný odhad absorpcie možno získať odčítaním percenta dávky v gastrointestinálnom trakte a/alebo výkaloch od ukazovateľa hmotnostnej bilancie. Pre výpočet percenta absorpcie pozri odsek 33 Pre vyšetrovanie exkrétov pozri odseky 44 – 49. Ak presný rozsah absorpcie nasledujúcej po orálnom dávkovaní nie je možné určiť pomocou štúdií hmotnostnej bilancie (napr. ak je vo výkaloch prítomných viac ako 20 % podanej dávky), mohli by byť potrebné ďalšie vyšetrenia. Tieto štúdie môžu zahŕňať buď 1. orálne podávanie testovanej chemikálie a meranie testovanej chemikálie v žlči, alebo 2. orálne a IV podávanie testovanej chemikálie a meranie čistej testovanej chemikálie prítomnej v moči, vo vydychovanom vzduchu a v mŕtvom tele v prípade oboch spôsobov podávania. Pri oboch plánoch štúdie sa vykoná meranie rádioaktivity ako zástupná metóda chemicky špecifickej analýzy testovanej chemikálie a metabolitov.

33. Ak sa vykonáva štúdia exkrécie žlčou, zvyčajne sa použije orálne podávanie. V tejto štúdii sa kanylujú žlčovody najmenej štyroch zvierat príslušného pohlavia (alebo oboch pohlaví, ak je to opodstatnené) a podá sa jednorazová dávka testovanej chemikálie. Po podaní testovanej chemikálie sa sleduje exkrécia rádioaktivity/testovanej chemikálie v žlči tak dlho, ako je potrebné na odhad percenta podanej dávky, ktorá sa vylúči touto cestou. Odhad možno použiť na priamy výpočet rozsahu orálnej absorpcie takto:

$$\text{percento absorpcie} = \begin{array}{c}(\text{množstvo vžlči} + \text{moči} + \text{vydychovanom vzduchu} \\ +\text{mŕtvom tele bez obsahu gastrointestinálneho} \\ \text{traktu})/\text{podané množstvo} \times 100\end{array}$$

34. V prípade niektorých tried testovanej chemikálie môže dôjsť k priamej sekrécii absorbovanej dávky cez črevné membrány. V takých prípadoch sa meranie percentuálnej dávky vo výkaloch po orálnom podaní dávky pri potkanovi s kanylovaným žlčovodom nepovažuje za reprezentatívne percento neabsorbovanej dávky. V prípade, že sa očakáva črevná sekrécia, sa odporúča, aby bolo percento absorbovanej dávky založené na absorpcii vypočítanej na základe porovnania exkrécie pri orálnom a IV podaní (potkan s neporušeným alebo s kanylovaným žlčovodom) (pozri odsek 35). Takisto sa odporúča, aby sa v prípade, keď sa kvantifikácia črevnej sekrécie považuje za nevyhnutnú, odmerala exkrécia v kanylovanom žlčovode potkana po IV podaní dávky.

▼M4

Biodostupnosť

35. Biodostupnosť možno stanoviť z kinetiky plazmy/krvi pri skupinách s orálnym a IV podávaním, ako sa uvádza v odsekoch 50 – 52, pomocou špecifickej chemickej analýzy testovanej chemikálie a/alebo príslušného metabolitu/metabolitov. Nevyžaduje sa teda rádiooznačená testovaná chemikália. Biodostupnosť (F) testovanej chemikálie alebo príslušného metabolitu/metabolitov možno vypočítať takto:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dávka_{IV}/Dávka_{exp})$$

kde AUC je oblasť pod krivkou závislosti koncentrácie plazmy a času a exp je experimentálny spôsob podávania (orálny, dermálny alebo inhalačný).

36. Na účely hodnotenia rizík systémových účinkov sa vo všeobecnosti pri porovnávaní systémových koncentrácií zo štúdií zvierat s analogickými biomonitorovacími údajmi zo štúdií expozície pracovníkov uprednostňuje biodostupnosť toxickej zložky pred percentom absorpcie. Situácia môže byť ešte zložitejšia, ak sú dávky v nelineárnom rozsahu, preto je dôležité, aby sa v rámci toxikokinetického skríningu stanovili dávky v lineárnom rozsahu.

Distribúcia v tkanivách

37. Poznatky o distribúcii testovanej chemikálie a/alebo jej metabolitov v tkanivách sú dôležité na identifikáciu cieľových tkanív a na pochopenie hlavných mechanizmov toxicity, ako aj na získanie informácií o potenciáli akumulácie a perzistencie testovanej chemikálie a metabolitov. Percento celkovej (rádioaktívnej) dávky v tkanivách, ako aj vo zvyšných častiach mŕtveho tela by sa malo odmerať aspoň na konci pokusu s exkréciou (napr. zvyčajne do siedmich dní po dávke alebo skôr, v závislosti od špecifického správania testovanej chemikálie). Ak sa na konci štúdie v tkanivách nezistí testovaná chemikália (napr. z dôvodu, že testovaná chemikália mohla byť eliminovaná pred ukončením štúdie pre krátky polčas), treba dať pozor, aby sa predišlo nesprávnej interpretácii údajov. V takejto situácii treba vyšetriť distribúciu v tkanivách v čase, keď má testovaná chemikália (a/alebo metabolit) najvyššiu koncentráciu v plazme/krvi (T_{max}) alebo v čase najvyššej močovej exkrécie (pozri odsek 38). Okrem toho môže byť potrebný odber tkanív v iných časoch s cieľom určiť distribúciu testovanej chemikálie a/alebo jej metabolitov v tkanivách na účely posúdenia závislosti od času (ak je to vhodné), pomôcť pri stanovení hmotnostnej bilancie a/alebo vyhovieť požiadavkám príslušného orgánu. Medzi tkanivá, ktoré treba odobrať, patrí pečeň, tuk, gastrointestinálny trakt, obličky, slezina, celá krv, zvyšné časti mŕtveho tela, tkanivá cieľových orgánov a všetky ostatné tkanivá (napr. štítna žľaza, erytrocyty, rozmnožovacie orgány, koža, oči – najmä pri zvieratách s pigmentáciou), ktoré majú potenciálny význam pre toxikologické hodnotenie testovanej chemikálie. Pre maximalizáciu využiteľnosti zvierat a v prípade, že je v štúdiách subchronickej alebo chronickej toxicity pozorovaná toxicita cieľového orgánu, by sa mala zvážiť analýza ďalších tkanív v tých istých časoch. Do správy sa uvedie aj koncentrácia (rádioaktívnych) rezíduí a pomer tkaniva a plazmy (krvi).

38. Hodnotenie distribúcie v tkanivách v ďalších časoch, ako je čas najvyššej koncentrácie v plazme/krvi (napr. T_{max}) alebo čas najvyššej močovej exkrécie, získané pomocou príslušných pokusov týkajúcich sa kinetiky plazmy/krvi alebo exkrécie môže byť takisto potrebné alebo ho môže požadovať príslušný orgán. Tieto informácie môžu byť užitočné na pochopenie toxicity a potenciálu akumulácie a perzistencie testovanej chemikálie a jej metabolitov. Je potrebné uviesť odôvodnenie výberu vzoriek. Vzorky na analýzu by vo všeobecnosti mali byť rovnaké ako vzorky uvedené vyššie (pozri odsek 37).

▼M4

39. Rádioaktivitu možno v štúdiách distribúcie v tkanivách kvantifikovať pomocou disekcie orgánov, homogenizácie, horenia a/alebo rozpustenia a následnej kvapalinovej scintilačnej spektroskopie (LSC) zachytených rezíduí. Určité metódy, ktoré sú v súčasnosti v rôznych štádiách vývoja, napr. kvantitatívna autorádiografia celého tela a receptorová mikroskopická autorádiografia, môžu preukázať užitočnosť pri zisťovaní distribúcie testovanej chemikálie v orgánoch a/alebo v tkanivách (3) (4).

40. V prípade iného ako orálneho spôsobu expozície sa odoberú a analyzujú konkrétne tkanivá, ako sú pľúca v prípade inhalačných štúdií alebo koža v prípade dermálnych štúdií. Pozri odseky 74 – 78.

Metabolizmus

41. Exkréty (a plazma, ak je to vhodné) sa odoberú na účely identifikácie a kvantifikácie nezmenenej testovanej chemikálie a metabolitov, ako sa uvádza v odsekoch 44 – 49. Zhromažďovanie exkrétov s cieľom uľahčiť identifikáciu metabolitov v rámci danej skupiny s dávkou je prípustné. Pri každom čase odberu sa odporúča profilovanie metabolitov. Ak tomu však bráni nedostatok vzoriek a/alebo rádioaktivity, je prípustný odber moču a výkalov v rôznych časoch. Odber od rôznych pohlaví alebo zvierat s rôznymi dávkami však prípustný nie je. Na vyšetrenie moču, výkalov, vydychovanej rádioaktivity zo zvierat, ktorým bola podaná dávka, a, ak je to vhodné, žlče by sa mali použiť vhodné kvalitatívne a kvantitatívne metódy.

42. Je potrebné vynaložiť primerané úsilie na identifikáciu všetkých metabolitov, ktoré predstavujú 5 % alebo viac podanej dávky, a zistiť metabolickú schému testovanej chemikálie. Je nutné identifikovať testované chemikálie, ktoré v exkrétoch predstavujú 5 % alebo viac podanej dávky. Identifikácia znamená presné štrukturálne určenie zložiek. Identifikácia sa najčastejšie vykonáva buď súbežnou chromatografiou metabolitu s využitím známych štandardov pomocou dvoch rôznych systémov, alebo metódami, pri ktorých možno zabezpečiť pozitívnu identifikáciu štruktúry, ako je hmotnostná spektrometria, jadrová magnetická rezonancia (NMR) atď. V prípade súbežnej chromatografie sa chromatografické metódy využívajúce rovnakú stacionárnu fázu pri dvoch rôznych systémoch rozpúšťania nepovažujú za vhodnú dvojmetódovú verifikáciu identity metabolitu, lebo tieto metódy nie sú nezávislé. Identifikácia pomocou súbežnej chromatografie by sa mala vykonať pomocou dvoch odlišných, analyticky nezávislých systémov, ako je chromatografia na tenkej vrstve (TLC) s reverznou a normálnou fázou a vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC). Za predpokladu, že chromatografická separácia má dostatočnú kvalitu, nie je potrebné ďalšie overenie spektroskopickými prostriedkami. Jednoznačnú identifikáciu možno prípadne zabezpečiť aj pomocou metód, ktoré poskytujú informácie o štruktúre, ako sú: kvapalinová chromatografia – hmotnostná spektrometria (LC-MS) alebo kvapalinová chromatografia – tandemová hmotnostná spektrometria (LC-MS/MS), plynová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou (GC-MS) a spektrometria NMR.

43. Ak identifikácia metabolitov predstavujúcich 5 % alebo viac podanej dávky nie je možná, v záverečnej správe treba uviesť odôvodnenie/vysvetlenie. Môže byť vhodné identifikovať metabolity predstavujúce menej ako 5 % podanej dávky s cieľom lepšie pochopiť metabolickú premenu na účely hodnotenia nebezpečnosti a/alebo rizík testovanej chemikálie. Ak je to možné, vždy treba uviesť potvrdenie štruktúry. To môže zahŕňať profilovanie v plazme, krvi alebo v iných tkanivách.

▼M4

Exkrécia

44. Miera a rozsah exkrécie podanej dávky by sa mala stanoviť na základe merania percenta (rádioaktívnej) dávky získanej z moču, výkalov a vydychovaného vzduchu. Tieto údaje budú užitočné aj pri stanovovaní hmotnostnej bilancie. Množstvá testovanej chemikálie (rádioaktivity) odstránenej prostredníctvom moču, výkalov a vydychovaného vzduchu sa stanovia v príslušných časových intervaloch (pozri odseky 47 – 49). Pokusy v opakovaných dávkach by mali byť vhodne naplánované, aby bolo možné zozbierať údaje o exkrécii a splniť ciele opísané v odseku 26. To umožní porovnanie s pokusmi v jednorazových dávkach.

45. Ak pilotná štúdia preukáže, že nedošlo k exkrécii významného množstva testovanej chemikálie (rádioaktivity) (podľa odseku 49) vo vydychovanom vzduchu, potom v konečnej štúdii nie je potrebný odber vydychovaného vzduchu.

46. Každé zviera sa umiestni do samostatnej metabolickej jednotky na odber exkrétov (moču, výkalov a vydychovaného vzduchu). Na konci každého obdobia odberu (pozri odseky 47 – 49) sa metabolické jednotky vyčistia vhodným rozpúšťadlom (tento krok sa nazýva „čistenie klietky“), aby sa zabezpečila maximálna výťažnosť testovanej chemikálie (rádioaktivity). Odber exkrétov sa ukončí po siedmich dňoch alebo po tom, ako sa zozbiera aspoň 90 % podanej dávky, podľa toho, čo nastane skôr.

47. Celkové množstvá testovanej chemikálie (rádioaktivity) v moči sa stanovia najmenej v dvoch časoch v prvý deň odberu, pričom jedno stanovenie by sa malo vykonať 24 hodín po dávkovaní, a následne každý deň až do konca štúdie. V prvý deň sa odporúča zvoliť si viac ako dva časy odberu (napr. po 6, 12 a 24 hodinách). V rámci výsledkov pilotných štúdií sa analyzujú informácie o alternatívnych alebo ďalších časoch odberu. Plán odberov je potrebné odôvodniť.

48. Celkové množstvá testovanej chemikálie (rádioaktivity) vo výkaloch sa stanovia na dennej báze, pričom prvý odber sa vykoná 24 hodín po dávkovaní a odbery budú pokračovať až do konca štúdie, pokiaľ z pilotných štúdií nevyplýva, že by bolo vhodnejšie použiť alternatívne alebo ďalšie časy odberov. Plánovanie alternatívnych plánov odberu je potrebné odôvodniť.

49. Odber vydychovaného CO_2 a iných prchavých materiálov možno v rámci pokusu danej štúdie prerušiť v prípade, že sa počas 24-hodinového obdobia odberu vo vydychovanom vzduchu zistí menej ako 1 % podanej dávky.

Štúdie časového priebehu

Kinetika plazmy/krvi

50. Účelom týchto štúdií je získať odhady základných TK parametrov [napr. C_{max}, T_{max}, polčas ($t_{1/2}$), AUC] testovanej chemikálie. Tieto štúdie sa môžu vykonávať s využitím jednej dávky alebo častejšie s využitím dvoch alebo viacerých dávok. Dávky sa stanovia na základe charakteru pokusu a/alebo otázky, ktorá sa skúma. Kinetické údaje môžu byť potrebné na riešenie otázok, ako je biodostupnosť testovanej chemikálie, a/alebo na objasnenie účinku dávky na klírens (napr. na objasnenie, či dôjde k nasýteniu klírensu v závislosti od dávky).

51. Pre tieto štúdie sa v každej skupine s dávkou použijú najmenej štyri zvieratá z jedného pohlavia. Výber pohlavia použitých zvierat je potrebné odôvodniť. Použitie oboch pohlaví (štyri samce a štyri samice) sa zváži, ak existujú dôkazy svedčiace o významných rozdieloch v toxicite, ktoré súvisia s pohlavím.

▼M4

52. Po podaní (rádiooznačenej) testovanej chemikálie sa pomocou vhodnej metodiky odberu v primeraných časoch z každého zvieraťa odoberú vzorky krvi. Objem a počet vzoriek krvi, ktoré možno odobrať z každého zvieraťa, môže byť obmedzený potenciálnymi účinkami opakovaných odberov na zdravie/fyziológiu zvierat a/alebo citlivosťou analytickej metódy. Vzorky sa analyzujú v prípade každého zvieraťa. Za určitých okolností (napr. pri charakterizácii metabolitov) môže byť nutné odobrať vzorky z viac ako jedného zvieraťa. Odobraté vzorky sa jasne identifikujú, pričom sa uvedie odôvodnenie odberu. Ak sa použije rádiooznačená testovaná chemikália, môže byť vhodné uviesť analýzu celkovej prítomnej rádioaktivity. V takom prípade sa celková rádioaktivita analyzuje v celej krvi a v plazme alebo v plazme a v červených krvinkách, čo umožní výpočet pomeru krvi a plazmy. Za iných okolností môžu byť potrebné konkrétnejšie vyšetrenia, ktoré si vyžadujú identifikáciu materskej zlúčeniny a/alebo metabolitov, alebo vyšetrenia na účely hodnotenia bielkovinových väzieb.

Kinetika ostatných tkanív

53. Účelom týchto štúdií je získať informácie o časovom priebehu na objasnenie otázok súvisiacich s problémami, ako sú druh toxického pôsobenia, bioakumulácia a bioperzistencia, a to prostredníctvom stanovenia úrovne testovanej chemikálie v jednotlivých tkanivách. Výber tkanív a počet hodnotených časových bodov bude závisieť od skúmaného problému a toxikologickej databázy testovanej chemikálie. Pri plánovaní týchto dodatočných štúdií kinetiky tkanív treba zohľadniť zozbierané informácie, ako sa uvádza v odsekoch 37 – 40. Tieto štúdie sa môžu vykonávať s využitím jednorazovej dávky alebo opakovaných dávok. Použitý prístup je potrebné podrobne odôvodniť.

54. Dôvody na vykonanie ďalších kinetických štúdií tkanív môžu zahŕňať:

— dôkazy o predĺženom polčase krvi, ktoré svedčia o možnej akumulácii testovanej chemikálie v jednotlivých tkanivách, alebo

— záujem zistiť, či sa dosiahla stabilná úroveň v konkrétnych tkanivách (napr. v štúdiách v opakovaných dávkach aj v prípade, že sa zdanlivo dosiahla stabilná úroveň testovanej chemikálie v krvi, môže byť záujem uistiť sa, či sa stabilná úroveň dosiahla aj v cieľových orgánoch).

55. Pri týchto druhoch štúdií časového priebehu sa orálne podá vhodná dávka testovanej chemikálie najmenej štyrom zvieratám v každej skupine s dávkou v každom časovom bode, pričom sa monitoruje časový priebeh distribúcie vo vybratých tkanivách. Ak nie je pozorovaná toxicita príznačná pre niektoré pohlavie, možno použiť iba jedno pohlavie. To, či sa bude analyzovať celková rádioaktivita alebo materská chemikália a/alebo metabolity, bude takisto závisieť od skúmaného problému. Hodnotenie distribúcie v tkanivách by sa malo vykonať s využitím primeraných metód.

Enzýmová indukcia/inhibícia

56. Štúdie skúmajúce možné účinky enzýmovej indukcie/inhibície alebo biotransformáciu skúmanej testovanej chemikálie môžu byť potrebné v jednom alebo vo viacerých z uvedených prípadov:

1. dostupné dôkazy indikujú vzťah medzi biotransformáciou testovanej chemikálie a zvýšenou toxicitou;

2. dostupné údaje o toxicite indikujú nelineárny vzťah medzi dávkou a metabolizmom;

▼M4

3. výsledky štúdií identifikácie metabolitov ukazujú identifikáciu potenciálne toxických metabolitov, ktoré mohli vzniknúť enzýmovým pôsobením indukovaným testovanou chemikáliou;

4. pri vysvetľovaní účinkov, pri ktorých sa predpokladá súvislosť s enzýmovou indukciou;

5. ak sa pozorujú toxikologicky významné zmeny v metabolickom profile testovanej chemikálie na základe pokusov *in vitro* alebo *in vivo* s využitím rôznych druhov zvierat alebo podmienok, môže byť potrebná charakterizácia pôsobiaceho enzýmu (enzýmov) (napr. enzýmov fázy I, ako sú izoenzýmy cytochróm P450 monooxygenázového systému, enzýmy fázy II, ako sú izoenzýmy sulfotransferázy alebo uridín-difosfát-glukuronosyltransferázy, alebo akýchkoľvek iných relevantných enzýmov). Tieto informácie možno použiť pri hodnotení vhodnosti živočíšnych druhov pre extrapoláciu druhov.

57. Na hodnotenie testovanej chemikálie v súvislosti so zmenami v TK sa použijú vhodné protokoly k štúdii, ktoré sú náležite overené a odôvodnené. Príklady plánov štúdií pozostávajú z opakovaného dávkovania neoznačenej testovanej chemikálie, po ktorom nasleduje jednorazová rádiooznačená dávka v deň 14 alebo opakované dávkovanie rádiooznačenej testovanej chemikálie a odber vzoriek v dňoch 1, 7 a 14 na stanovenie profilov metabolitov. Pomocou opakovaného dávkovania rádiooznačenej testovanej chemikálie možno získať aj informácie o bioakumulácii (pozri odsek 26).

DOPLŇUJÚCE PRÍSTUPY

58. Doplňujúce prístupy presahujúce rámec pokusov *in vivo* opísaných v tejto testovacej metóde môžu priniesť užitočné informácie o absorpcii, distribúcii, metabolizme alebo eliminácii testovanej chemikálie pri určitých živočíšnych druhoch.

Použitie informácií *in vitro*

59. Pomocou vhodných testovacích systémov možno v štúdiách *in vitro* objasniť viaceré otázky týkajúce sa metabolizmu testovanej chemikálie. Čerstvo izolované alebo kultivované hepatocyty a subcelulárne frakcie (napr. mikrozómy a cytosól alebo frakcia S9) z pečene možno použiť na štúdium možných metabolitov. Pre hodnotenie rizík môže byť zaujímavý lokálny metabolizmus v cieľovom orgáne, napr. v pľúcach. Na tieto účely môžu byť užitočné mikrozómové frakcie cieľových tkanív. Štúdie s mikrozómami môžu byť prínosné pri riešení potenciálnych rozdielov medzi pohlaviami a životnými fázami a pri charakterizácii enzýmových parametrov (K_m a V_{max}), ktoré môžu pomôcť pri hodnotení závislosti metabolizmu od dávky v súvislosti s úrovňami expozície. Okrem toho môžu byť mikrozómy užitočné pri identifikácii špecifických mikrozómových enzýmov podieľajúcich sa na metabolizme testovanej chemikálie, ktoré môžu mať význam pri extrapolácii živočíšnych druhov (pozri aj odsek 56). Takisto potenciál indukcie biotransformácie možno preskúmať pomocou pečeňových subcelulárnych frakcií (napr. mikrozómov a cytosólu) zvierat, ktoré boli skúmanej testovanej chemikálii vystavené skôr, *in vitro* prostredníctvom štúdií hepatocytovej indukcie alebo zo špecifických bunkových línií vyjadrujúcich relevantné enzýmy. Za určitých okolností a v primeraných podmienkach možno pri určovaní potenciálnych rozdielov v biotransformácii medzi živočíšnymi druhmi zvážiť použitie subcelulárnych frakcií pochádzajúcich z ľudských tkanív. Výsledky z vyšetrení *in vitro* môžu byť užitočné aj pri vývoji modelov PBTK (5).

▼M4

60. Štúdie dermálnej absorpcie *in vitro* môžu priniesť doplňujúce informácie na účely charakterizácie absorpcie (6).

61. Primárne bunkové kultúry z pečeňových buniek a čerstvé plátky tkanív možno použiť na zodpovedanie podobných otázok ako v prípade pečeňových mikrozómov. V určitých prípadoch je možné zodpovedať konkrétne otázky pomocou bunkových línií s vymedzeným vyjadrením relevantného enzýmu alebo pomocou kultivovaných bunkových línií. V určitých prípadoch môže byť užitočné študovať inhibíciu a indukciu špecifických cytochróm P450 izozýmov (napr. CYP1A1, 2E1, 1A2 a iných) a/alebo enzýmov fázy II materskej zlúčeniny s využitím štúdií *in vitro*. Získané informácie môžu mať význam v prípade zlúčenín s podobnou štruktúrou.

Použitie toxikokinetických údajov zo štúdií toxicity ako doplňujúcich informácií

62. Analýza vzoriek krvi, tkanív a/alebo exkrétov odobratých v priebehu akýchkoľvek iných štúdií toxicity môže priniesť údaje o biodostupnosti, zmenách koncentrácií v plazme v závislosti od času (AUC, C_{max}), potenciáli bioakumulácie, klírense a zmenách súvisiacich s pohlavím alebo polčasom v metabolizme a kinetike.

63. Úvahy o pláne štúdie možno použiť na zodpovedanie otázok týkajúcich sa: nasýtenia absorpcie, ciest biotransformácie alebo exkrécie pri vyšších úrovniach dávky, pôsobenia nových metabolických ciest pri vyšších dávkach a obmedzenia toxických metabolitov na vyššie dávky.

64. Ostatné úvahy v rámci hodnotenia nebezpečnosti môžu zahŕňať otázky, ako napríklad:

— citlivosť súvisiaca s vekom v dôsledku rozdielov stavu hematoencefalickej bariéry, obličiek a/alebo detoxifikačných schopností,

— citlivosť subpopulácie v dôsledku rozdielov medzi schopnosťami biotransformácie alebo iných TK rozdielov,

— rozsah expozície plodu v dôsledku transplacentárneho prenosu chemikálií alebo expozície novorodenca prostredníctvom laktácie.

Použitie toxikokinetického modelovania

65. Toxikokinetické modely môžu byť užitočné pri rôznych aspektoch hodnotenia nebezpečnosti a rizík, ako napríklad pri predpovedaní systémovej expozície a dávky vo vnútorných tkanivách. Okrem toho sa môžu vyšetrovať konkrétne otázky týkajúce sa druhu pôsobenia, pričom tieto modely môžu predstavovať základ pre extrapoláciu živočíšnych druhov, spôsoby expozície, štruktúry dávkovania a hodnotenie rizík pre človeka. Údaje užitočné pre vývoj PBTK modelov pre testovanú chemikáliu pri akomkoľvek živočíšnom druhu zahŕňajú 1. rozdeľovacie koeficienty; 2. biochemické konštanty a fyziologické parametre; 3. absorpčné parametre pre konkrétne cesty a 4. kinetické údaje *in vivo* pre hodnotenie modelov [napr. parametre klírensu pre relevantné (> 10 %) vylučovacie cesty, K_m a V_{max} pre metabolizmus]. Experimentálne údaje použité pri vývoji modelov by sa mali získať metódami, ktoré sú z vedeckého hľadiska primerané, pričom výsledky modelov treba overiť. Na uľahčenie vývoja nekompartmentových fyziologicky založených modelov sa často stanovujú parametre špecifické pre testovanú chemikáliu a živočíšny druh, ako je miera absorpcie, rozdeľovacia konštanta krv – tkanivo a konštanta miery metabolizmu (7).

▼M4

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

66. Odporúča sa, aby správa o štúdii zahŕňala obsah.

Hlavná časť správy

67. Hlavná časť správy zahŕňa informácie získané pomocou tejto testovacej metódy, ktoré sú rozdelené do oddielov a odsekov takto:

Zhrnutie

68. Tento oddiel správy o štúdii obsahuje zhrnutie plánu štúdie a opis použitých metód. Takisto by mal poukazovať na hlavné zistenia týkajúce sa hmotnostnej bilancie, charakteru a veľkosti metabolitov, zvyškov tkanív, klírensu, potenciálu bioakumulácie, rozdielov medzi pohlaviami atď. Zhrnutie by malo byť dostatočne podrobné, aby umožnilo hodnotenie zistení.

Úvod

69. Tento oddiel správy obsahuje ciele, odôvodnenie a plán štúdie, ako aj príslušné odkazy a akékoľvek informácie o skutočnostiach, ktoré štúdii predchádzali.

Materiály a metódy

70. Tento oddiel správy obsahuje podrobné opisy všetkých súvisiacich informácií vrátane týchto údajov:

a) Testovaná chemikália

Tento pododdiel zahŕňa identifikáciu testovanej chemikálie: chemický názov, molekulárnu štruktúru, kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie jej chemického zloženia, chemickú čistotu a, ak je to možné, druh a množstvá všetkých prímesí. Takisto zahŕňa informácie o fyzikálnochemických vlastnostiach vrátane fyzikálneho skupenstva, farby, makroskopickej rozpustnosti a/alebo rozdeľovacieho koeficientu, stability a, ak je to vhodné, žieravosti. Podľa potreby sa uvedú informácie o izoméroch. Ak je testovaná chemikália rádiooznačená, tento pododdiel bude obsahovať tieto informácie: druh rádionuklidu, umiestnenie značky, špecifická aktivita a rádiochemická čistota.

Uvedie sa druh alebo opis všetkých nosičov, riedidiel, suspenzných látok a emulzifikátorov alebo iných materiálov použitých pri podávaní testovanej chemikálie.

b) Pokusné zvieratá

Tento pododdiel obsahuje informácie o pokusných zvieratách vrátane výberu živočíšneho druhu a odôvodnenia, kmeňa a veku na začiatku štúdie, pohlavia, ako aj telesnej hmotnosti, zdravotného stavu a chovu zvierat.

c) Metódy

Tento pododdiel obsahuje informácie o pláne štúdie a použitej metodike. Zahŕňa tieto údaje:

1. odôvodnenie akýchkoľvek zmien spôsobu expozície a podmienok expozície, ak je to vhodné;

▼M4

2. odôvodnenie výberu úrovní dávok;

3. opis pilotných štúdií použitých v experimentálnom pláne následných štúdií, ak je to vhodné, pričom sa predložia doplňujúce údaje o pilotných štúdiách;

4. postup prípravy dávkovacieho roztoku a druh rozpúšťadla alebo nosiča, ak sa použil;

5. počet skupín, ktorým sa aplikovala chemikália, a počet zvierat v skupine;

6. úrovne a objem dávkovania (a špecifická aktivita dávky, ak sa použila rádioaktivita);

7. spôsob (spôsoby) a metódy podávania;

8. frekvencia dávkovania;

9. obdobie pôstu (ak sa použilo);

10. celková rádioaktivita na jedno zviera;

11. zaobchádzanie so zvieratami;

12. odber vzoriek a manipulácia s nimi;

13. analytické metódy použité na separáciu, kvantifikáciu a identifikáciu metabolitov;

14. detekčný limit pre použité metódy;

15. iné pokusné merania a postupy, ktoré sa použili (vrátane overenia metód analýzy metabolitov).

d) Štatistická analýza

Ak sa na analyzovanie zistení štúdie použije štatistická analýza, je potrebné uviesť dostatočné informácie o použitej metóde analýzy a o počítačovom programe, aby mohol analýzu opätovne vyhodnotiť a zrekonštruovať nezávislý kontrolór/štatistik.

V prípade štúdií modelovania systémov, ako je PBTK, by prezentácia modelov mala zahŕňať kompletný opis modelu, ktorý umožní nezávislú rekonštrukciu a overenie modelu (pozri odsek 65 a dodatok: Vymedzenie pojmov).

Výsledky

71. Všetky údaje sa zhrnú do tabuliek s príslušným štatistickým hodnotením a opíšu sa v texte v rámci tohto oddielu. Výpočtové údaje o rádioaktivite sa zhrnú a uvedú v závislosti od štúdie, zvyčajne ako mikrogramové alebo miligramové ekvivalenty na hmotnosť vzorky, hoci je možné použiť aj iné jednotky. Tento oddiel zahŕňa grafické znázornenia zistení, reprodukciu reprezentatívnych chromatografických a spektrometrických údajov, identifikáciu/kvantifikáciu metabolitov a navrhované metabolické cesty vrátane molekulárnej štruktúry metabolitov. Okrem toho sa v tomto oddiele podľa možnosti uvedú tieto informácie:

1. Množstvo a percentuálna výťažnosť rádioaktivity v moči, výkaloch, vydychovanom vzduchu a v moči a výkaloch zo zvyškov v klietke:

— v prípade dermálnych štúdií sa uvedú aj údaje o výťažnosti testovanej chemikálie z kože po aplikácii chemikálie, z omytia kože a údaje o reziduálnej rádioaktivite v krycom obväze kože a metabolickej jednotke, ako aj výsledky štúdie dermálneho omytia. Ďalšie informácie sú uvedené v odsekoch 74 – 77,

▼M4

— v prípade inhalačných štúdií sa uvedú aj údaje o výťažnosti testovanej chemikálie z pľúc a nosových tkanív (8). Ďalšie informácie sú uvedené v odseku 78;

2. distribúcia v tkanivách uvádzaná ako percento podanej dávky a koncentrácia (mikrogramové ekvivalenty na gram tkaniva) a pomery tkanivo – krv alebo tkanivo – plazma;

3. materiálová bilancia získaná z každej štúdie vrátane vyšetrenia telesných tkanív a exkrétov;

4. koncentrácie plazmy a toxikokinetické parametre (biodostupnosť, AUC, Cmax, Tmax, klírens, polčas) po podaní príslušným spôsobom (spôsobmi) expozície;

5. rýchlosť a rozsah absorpcie testovanej chemikálie po podaní príslušným spôsobom (spôsobmi) expozície;

6. množstvá testovanej chemikálie a metabolitov (uvádzané ako percento podanej dávky) získané z exkrétov;

7. odkaz na dodatky, ktoré obsahujú údaje o všetkých meraných parametroch pri jednotlivých zvieratách (napr. podávanie dávok, percentuálna výťažnosť, koncentrácie, TK parametre atď.);

8. obrázok s navrhovanými metabolickými cestami a molekulárnou štruktúrou metabolitov.

Rozbor a závery

72. V tomto oddiele autor/autori:

1. uvedie/uvedú navrhovanú metabolickú cestu na základe výsledkov metabolizmu a charakteru testovanej chemikálie;

2. analyzuje/analyzujú všetky potenciálne živočíšne druhy a rozdiely medzi pohlaviami týkajúce sa charakteru a/alebo biotransformácie testovanej chemikálie;

3. uvedie/uvedú v tabuľkách a zanalyzuje/zanalyzujú identifikáciu a veľkosť metabolitov, klírens, potenciál bioakumulácie a úroveň tkanivových rezíduí materskej chemikálie a/alebo metabolitu (metabolitov), ako aj možné zmeny v TK parametroch súvisiace s dávkou;

4. začlení/začlenia do tohto oddielu všetky relevantné TK údaje získané v priebehu štúdií toxicity;

5. uvedie/uvedú stručný záver, ktorý možno podložiť zisteniami štúdie;

6. vloží/vložia oddiely (podľa potreby).

73. Na uvedenie podkladových bibliografických informácií, tabuliek, obrázkov, dodatkov atď. možno použiť ďalšie oddiely.

▼M4

ALTERNATÍVNE SPÔSOBY EXPOZÍCIE

Dermálna

Dermálna aplikácia

74. V tomto oddiele sa uvádzajú špecifické informácie o vyšetrení toxikokinetiky testovanej chemikálie pri dermálnom spôsobe podávania. V prípade dermálnej absorpcie je potrebné si preštudovať kapitolu B.44 tejto prílohy [Absorpcia kožou: metóda *in vivo* (9)]. Na ostatné parametre, ako je distribúcia a metabolizmus, možno použiť túto testovaciu metódu B.36. V prípade dermálnej aplikácie sa použije jedna alebo viac úrovní dávok testovanej chemikálie. Testovaná chemikália (napríklad čistý, zriedený alebo vytvorený materiál obsahujúci testovanú chemikáliu, ktorá sa aplikuje na kožu) by mala byť rovnaká (prípadne realisticky zástupná) ako chemikália, ktorej môže byť vystavený človek alebo iný potenciálny cieľový živočíšny druh. Úroveň/úrovne dávky sa vyberie/vyberú podľa odsekov 20 – 26 tejto testovacej metódy. Medzi faktory, ktoré možno vziať pri výbere dermálnej dávky do úvahy, patrí predpokladaná expozícia človeka a/alebo dávky, pri ktorých bola v iných štúdiách toxicity pozorovaná toxicita. Dermálna/dermálne dávka/dávky sa podľa potreby rozpustí/rozpustia vo vhodnom nosiči a aplikujú v objeme primeranom na podávanie dávok. Krátko pred začatím testu sa pokusným zvieratám ostrihá srsť na chrbte. Vyholenie srsti je takisto prípustné, malo by sa však uskutočniť asi 24 hodín pred testom. Pri strihaní alebo holení treba brať ohľad na to, aby sa nepoškodila koža zvierat, lebo by to viedlo k zmene priepustnosti. Na účely aplikácie testovanej chemikálie sa približne 10 % povrchu tela zbaví srsti. V prípade vysokotoxických chemikálií môže povrchová plocha predstavovať menej ako približne 10 %, ale čo najväčšia časť tejto plochy sa pokryje tenkým a rovnomerným filmom. Vo všetkých skupinách dermálneho testovania sa na aplikáciu použije tá istá povrchová plocha. Plochy, na ktoré bola chemikália aplikovaná, sa prikryjú vhodným krycím obväzom, ktorý sa upevní na dané miesto. Zvieratá sa umiestnia samostatne.

75. Na posúdenie množstva aplikovanej dávky testovanej chemikálie, ktorú možno z kože odstrániť omytím ošetrenej plochy kože šetrným mydlom a vodou, by sa mala vykonať štúdia dermálneho omytia. Táto štúdia môže byť užitočná aj pri stanovovaní hmotnostnej bilancie v prípade, že sa testovaná chemikálie podáva cez kožu. V tejto štúdii dermálneho omytia sa dvom zvieratám jednorazovo aplikuje dávka testovanej chemikálie. Úroveň dávky sa vyberie podľa odseku 23 tejto testovacej metódy (pre rozbor času kontaktu s kožou pozri aj odsek 76). Množstvá testovanej chemikálie získané z omytia sa stanovia s cieľom posúdiť efektívnosť eliminácie testovanej chemikálie prostredníctvom omytia.

76. Pokiaľ tomu nebráni žieravosť, testovaná chemikália sa aplikuje a nechá pôsobiť na koži minimálne šesť hodín. V čase odstránenia krycieho obväzu sa ošetrená plocha umyje podľa postupu uvedeného v štúdii dermálneho omytia (pozri odsek 75). Krycí obväz aj zmytý materiál sa analyzujú s cieľom zistiť, či neobsahujú zvyšky testovanej chemikálie. Na konci štúdií sa každé zviera humánne utratí podľa bodu (2) a ošetrená koža sa odstráni. Na určenie rezíduí testovanej chemikálie (rádioaktivity) sa analyzuje vhodný rez ošetrenej kože.

77. Na účely toxikokinetického hodnotenia liekov môžu byť potrebné odlišné postupy, ktoré sú v súlade s príslušným regulačným systémom.

▼M4

Inhalačná

78. Použije sa jedna koncentrácia (alebo podľa potreby viac koncentrácií) testovanej chemikálie. Koncentrácia/koncentrácie sa vyberie/vyberú podľa odsekov 20 – 26 tejto testovacej metódy. Inhalačná aplikácia sa vykoná pomocou nosového kónu alebo zariadenia na oblasť hlavy, aby sa predišlo absorpcii inými expozičnými cestami (8). Ak sa pri inhalačnej expozícii použijú iné podmienky, je potrebné v dokumentácii uviesť odôvodnenie tejto zmeny. Je potrebné vymedziť trvanie expozície inhaláciou. Expozícia zvyčajne trvá štyri až šesť hodín.

LITERATÚRA

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, Paríž.

2. OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paríž.

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, W. E. (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25 – 40.

5. Loizou, G., Spendiff, M., Barton, H. A., Bessems, J., Bois, F. Y., d'Yvoire, M. B., Buist, H., Clewell, H. J. 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. Kapitola B.45 tejto prílohy, Absorpcia kožou: metóda in vitro.

7. IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Ženeva, Svetová zdravotnícka organizácia, Medzinárodný program chemickej bezpečnosti.

8. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paríž.

9. Kapitola B.44 tejto prílohy, Absorpcia kožou: metóda in vivo.

10. Barton, H. A. a kol. (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., a Perrier, D., (1982), Pharmacokinetics, druhé vydanie, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Dodatok

VYMEDZENIE POJMOV

Absorpcia*:* proces (procesy) vstrebávania chemikálií do tkanív alebo cez tkanivá. Absorpcia sa vzťahuje na materskú zlúčeninu a všetky jej metabolity. Nesmie sa zamieňať s „biodostupnosťou“.

Akumulácia (bioakumulácia): priebežné zvyšovanie množstva testovanej chemikálie v tkanivách (zvyčajne v tukových tkanivách po opakovanej expozícii). Ak je príjem testovanej chemikálie do tela vyšší ako rýchlosť, ktorou sa chemikália odstraňuje, organizmus testovanú chemikáliu hromadí a môže dôjsť k vzniku toxických koncentrácií testovanej chemikálie.

ADME*:* skratka pre „absorpciu, distribúciu, metabolizmus a exkréciu“.

AUC*:* (plocha pod krivkou závislosti koncentrácie v plazme a času): plocha pod krivkou v znázornení koncentrácie testovanej chemikálie v plazme za čas. Predstavuje celkové množstvo testovanej chemikálie, ktorú telo absorbovalo počas vopred stanoveného obdobia. V lineárnych podmienkach je krivka AUC (od nulového času po nekonečno) priamo úmerná celkovému množstvu testovanej chemikálie absorbovanej telom bez ohľadu na mieru absorpcie.

Autorádiografia*:* (autorádiografia celého tela): používa sa na kvalitatívnu a/alebo kvantitatívnu lokalizáciu rádioaktívnej testovanej chemikálie v tkanivách. Táto metóda využíva röntgenový film alebo najnovšie digitálny phosphorimaging (fosforové zobrazovanie) na vizualizáciu rádioaktívne značených molekúl alebo fragmentov molekúl prostredníctvom zaznamenávania žiarenia emitovaného v rámci objektu, ktorý je predmetom štúdie. Kvantitatívna autorádiografia celého tela v porovnaní s disekciou orgánov môže mať výhody pri hodnotení distribúcie testovanej chemikálie a pri hodnotení celkovej výťažnosti a rozkladu rádioaktívneho materiálu v tkanivách. Významnou výhodou je napríklad možnosť využitia na modeli zvieraťa s pigmentáciou na účely hodnotenia možnej súvislosti testovanej chemikálie s melanínom, ktorý môže viazať určité molekuly. Hoci táto metóda môže zabezpečiť vhodné zobrazenia celého tela s miestami viazania s vysokou kapacitou a nízkou afinitou, môže mať obmedzenia pri detegovaní špecifických cieľových miest, ako sú miesta viazania receptorov, kde je na detekciu potrebné pomerne vysoké rozlíšenie a vysoká citlivosť. Ak sa použije autorádiografia, pokusy určené na stanovenie hmotnostnej bilancie podanej zlúčeniny sa vykonajú ako samostatná skupina alebo v rámci samostatnej štúdie oddelenej od pokusu na zistenie distribúcie v tkanivách, kde sa všetky exkréty (ktoré môžu zahŕňať aj vydychovaný vzduch) a celé mŕtve telá homogenizujú a vyšetria pomocou kvapalinovej scintilačnej spektroskopie.

Exkrécia žlčou*:* exkrécia prostredníctvom žlčovodu.

Bioakumulácia*:* pozri „akumulácia“.

Biodostupnosť*:* časť podanej dávky, ktorou sa dosahuje systémový obeh alebo ktorá je dostupná na mieste fyziologickej aktivity. Zvyčajne sa biodostupnosť testovanej chemikálie vzťahuje na materskú zlúčeninu, ale môže sa vzťahovať aj na jej metabolit. Zohľadňuje iba jednu chemickú formu. *Poznámka* biodostupnosť a absorpcia nie je to isté. Rozdiel medzi napríklad orálnou absorpciou (t. j. prítomnosťou v črevnej stene a v portálnom obehu) a biodostupnosťou (t. j. prítomnosťou v systémovej krvi a v tkanivách) môže vzniknúť v súvislosti s chemickým rozkladom v dôsledku metabolizmu črevnej steny alebo v dôsledku spätného odtoku do črevného lumenu alebo predsystémového metabolizmu v pečeni okrem iných faktorov (10). Biodostupnosť toxickej zložky (materskej zlúčeniny alebo metabolitu) je kritický parameter pri hodnotení rizika pre človeka (extrapolácia vysokých a nízkych dávok, extrapolácia jednotlivých spôsobov expozície) na odvodenie internej hodnoty z externej úrovne NOAEL alebo BMD (aplikovanej dávky). Na vznik účinkov na pečeň po orálnom podaní je postačujúca orálna absorpcia. V prípade každého účinku, ktorý sa prejaví inde ako pri vstupnej bráne, je však vo všeobecnosti spoľahlivejším parametrom, ktorý možno ďalej použiť pri hodnotení rizík, biodostupnosť, nie absorpcia.

Bioperzistencia*:* pozri „perzistencia“.

▼M4

Biotransformácia*:* (zvyčajne enzýmová) chemická premena skúmanej testovanej chemikálie na inú chemikáliu v tele. Synonymom je „metabolizmus“.

C_{max}*:* buď maximálna (vrcholová) koncentrácia v krvi (v plazme/sére) po podaní alebo maximálna (vrcholová) exkrécia (v moči alebo vo výkaloch) po podaní.

Klírens*:* kvantitatívny ukazovateľ rýchlosti, ktorou sa testovaná chemikália odstraňuje z krvi, plazmy alebo určitého tkaniva za jednotku času.

Kompartment*:* štrukturálna alebo biochemická zložka (alebo jednotka) tela, tkaniva alebo bunky, ktorá ja oddelená od zvyšku.

Detoxifikačné cesty*:* súbor krokov, ktoré vedú k odstráneniu toxických chemikálií z tela buď metabolickou premenou, alebo exkréciou.

Distribúcia*:* disperzia testovanej chemikálie a jej derivátov v organizme.

Enzýmy/izozýmy*:* bielkoviny, ktoré katalyzujú chemické reakcie. Izozýmy sú enzýmy, ktoré katalyzujú podobné chemické reakcie, ale líšia sa svojou sekvenciou aminokyselín.

Enzýmové parametre*:* K_m: Michaelisova konštanta a V_{max}: maximálna rýchlosť.

Exkrécia*:* proces/procesy, ktorým/ktorými sa podaná testovaná chemikália a/alebo jej metabolity odstraňujú z tela.

Exogénne*:* zavedené z prostredia mimo organizmu alebo systému alebo vytvorené v prostredí mimo organizmu alebo systému.

Extrapolácia*:* odvodenie jednej alebo viacerých neznámych hodnôt na základe toho, čo je známe alebo bolo pozorované.

Polčas ($t_{1/2}$)*:* čas potrebný na pokles koncentrácie testovanej chemikálie v kompartmente na polovicu. Zvyčajne sa vzťahuje na koncentráciu v plazme alebo na množstvo testovanej chemikálie v celom tele.

Indukcia/enzýmová indukcia*:* enzýmová syntéza ako reakcia na environmentálny podnet alebo induktorovú molekulu.

Linearita/lineálna kinetika*:* proces je lineárny z hľadiska kinetiky, ak sú všetky rýchlosti prechodu medzi kompartmentmi priamo úmerné prítomným množstvám alebo koncentráciám, t. j. sú prvého rádu. Následne sú klírens a objemy distribúcie konštantné, rovnako ako polčasy. Dosiahnuté koncentrácie sú priamo úmerné miere dávkovania (expozícii) a akumulácia sa dá ľahšie predpovedať. Linearitu/nelinearitu možno hodnotiť porovnaním príslušných parametrov, napr. AUC, po rôznych dávkach alebo po jednorazovej a opakovanej expozícii. Chýbajúca závislosť od dávky môže indikovať nasýtenie enzýmov podieľajúcich sa na metabolizme zlúčeniny, rast krivky AUC po opakovanej expozícii v porovnaní s jednorazovou expozíciou môže indikovať inhibíciu metabolizmu a klesanie krivky AUC môže indikovať indukciu metabolizmu [pozri aj bod (11)].

▼M4

Hmotnostná bilancia*:* započítanie vstupov a výstupov testovanej chemikálie do/zo systému.

Materiálová bilancia*:* pozri „hmotnostná bilancia“.

Mechanizmus (druh) toxicity/mechanizmus (druh) pôsobenia*:* mechanizmus pôsobenia sa vzťahuje na špecifické biochemické interakcie, prostredníctvom ktorých testovaná chemikália vytvára svoj účinok. Druhom pôsobenia sa myslia bežné cesty vedúce k toxicite testovanej chemikálie.

Metabolizmus*:* synonymom je „biotransformácia“.

Metabolity*:* produkty metabolizmu alebo metabolických procesov.

Orálna absorpcia*:* percento dávky testovanej chemikálie absorbované z miesta podania (t. j. z gastrointestinálneho traktu). Tento kritický parameter možno použiť na zistenie frakcie podanej testovanej chemikálie, ktorá sa dostane do vrátnice a následne do pečene.

Rozdeľovací koeficient*:* takisto známy ako distribučný koeficient, je ukazovateľ diferenčnej rozpustnosti chemikálie v dvoch rozpúšťadlách.

Vrcholové úrovne v krvi (plazme/sére)*:* maximálna (vrcholová) koncentrácia v krvi (plazme/sére) po podaní (pozri aj „C_{max}“).

Perzistencia (bioperzistencia)*:* dlhodobá prítomnosť chemikálie (v biologickom systéme) v dôsledku rezistencie voči rozkladu/eliminácii.

Krížový prístup*:* informácie o parametri jednej alebo viacerých chemikálií sa použijú na predpovedanie parametra cieľovej chemikálie.

Receptorová mikroskopická autorádiografia (alebo receptorová mikroautorádiografia): túto metódu možno použiť na zistenie xenobiotickej interakcie so špecifickými miestami tkanív alebo s bunkovými populáciami, ako napríklad pri štúdiách viazania receptorov alebo špecifického druhu pôsobenia, ktoré môžu vyžadovať vysoké rozlíšenie a vysokú citlivosť, ktoré nemožno dosiahnuť inými metódami, ako je napríklad autorádiografia celého tela.

Spôsob podania (orálny, IV, dermálny, inhalačný atď.): vzťahuje sa na spôsob, akým sa chemikálie podajú do tela (napr. orálne cez sondu, orálne v krmive, dermálne, inhaláciou, intravenózne atď.).

Nasýtenie*:* stav, v ktorom jeden alebo viacero kinetických (napr. absorpcia, metabolizmus alebo klírens) procesov dosiahli maximum (teda „sú nasýtené“).

Citlivosť*:* schopnosť metódy alebo nástroja rozlišovať medzi reakciami merania predstavujúcimi rôzne úrovne skúmanej premennej.

Stabilné úrovne v krvi (plazme)*:* nerovnovážny stav otvoreného systému, v ktorom sú všetky sily pôsobiace na systém presne vyvážené protichodnými silami takým spôsobom, že jeho zložky majú stabilnú koncentráciu, hoci dochádza k toku čiastočiek cez systém.

Modelovanie systémov (fyziologicky založené toxikokinetické, farmakokineticky založené, fyziologicky založené farmakokinetické, biologicky založené atď.): abstraktný model, ktorý využíva matematický jazyk na opis správania systému.

Cieľové tkanivo*:* tkanivo, v ktorom sa preukazuje hlavný nepriaznivý účinok toxikantu.

▼**M4**

Testovaná chemikália*:* akákoľvek chemikália alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Distribúcia v tkanivách*:* reverzibilný pohyb testovanej chemikálie z jedného miesta v tele na iné miesto. Distribúciu v tkanivách možno študovať pomocou disekcie orgánov, homogenizácie, horenia a kvapalinovej scintilačnej spektroskopie alebo kvalitatívnej a/alebo kvantitatívnej autorádiografie celého tela. Prvý spôsob je užitočný na získanie koncentrácie a percenta výťažnosti z tkanív a zvyškov mŕtveho tela tých istých zvierat, ale nemusí zabezpečovať dostatočné rozlíšenie pre všetky tkanivá a môže mať nižšiu ako ideálnu celkovú výťažnosť (< 90 %). Vymedzenie druhej metódy pozri vyššie.

T_{max}: čas na dosiahnutie C_{max}.

Toxikokinetika (farmakokinetika): štúdia absorpcie, distribúcie, metabolizmu a exkrécie chemikálií za určitý čas.

Validácia (overenie) modelov: proces hodnotenia vhodnosti modelu s cieľom konzistentne opísať dostupné toxikokinetické údaje. Modely možno hodnotiť prostredníctvom štatistického a vizuálneho porovnania predpovedí modelov s experimentálnymi hodnotami a spoločnej nezávislej premennej (napr. času). Rozsah hodnotenia je potrebné odôvodniť v súvislosti s plánovaným využitím modelu.

▼B

B.37. ONESKORENÁ NEUROTOXICITA ORGANOFOSFOROVYCH LÁTOK PO AKÚTNEJ EXPOZÍCII ICH ÚČINKOM

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Pri stanovení a vyhodnotení toxických účinkov látok je dôležité zvážiť potenciál určitých skupín látok spôsobujúcich špecifické druhy neurotoxicity, ktoré nemusia byť zistené (objavené) v iných štúdiách toxicity. U určitých organofosforových zlúčenín sa zistilo, že spôsobujú oneskorenú neurotoxicitu a je nutné ich z tohto hľadiska hodnotiť.

Látky, ktoré môžu spôsobovať oneskorenú polyneuropatiu sa identifikujú pri použití screeningových testov *in vitro*; pravdaže, negatívne výsledky z *in vitro* štúdií neposkytujú dôkaz, že testovaná látka nie je neurotoxická.

Pozri aj všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Organofosforové zlúčeniny zahŕňajú nenabité organofosforové estery, tioestery alebo anhydridy organofosforečných, organofosfónových alebo organofosforamidových kyselín, alebo príbuzných tiolfosforových, tiónfosforových, tiolfosfónových, tiónfosfónových alebo fosforotioamínových kyselín, alebo iné látky spôsobujúce oneskorenú neurotoxicitu občas pozorovanú v tejto kategórie látok.

Oneskorená neurotoxicita je syndróm spájaný s predĺženým oneskorením nábehu ataxie, distálnej axonopatie v mieche a periférnom nervstve, a inhibíciou a starnutím neuropatiou postihnutej esterázy (NTE) v nervových tkanivách.

1.3. REFERENČNÉ LATKY

Referenčná látka sa môže testovať s pozitívnou kontrolnou skupinou ako prostriedok dôkazu, že za daných laboratórnych testovacích podmienok sa odozva testovaných druhov zvierat významne nemení.

Ako príklad široko používaného neurotoxikantu slúži tri-o-tolylfosfát (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, CAS názov: fosforečná kyselina, tris(2-metylfenyl)ester, známy tiež ako tris-o-krezylfosfát.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Skupine sliepok domácich, ktoré sú (ak je to vhodné) chránené od akútneho cholinergného účinku, sa orálne podáva jedna dávka testovanej látky. Zvieratá sa pozorujú 21 dní, pričom sa sledujú abnormality v správaní, ataxia, a paralýza. Biochemické merania a najmä inhibícia neuropatiou postihnutej esterázy (NTE) sa vykonávajú na náhodne vybraných sliepkach každej skupiny, bežne 24 a 48 hodín po podaní látky. 21 dní po expozícii sa zvyšok sliepok usmrtí a uskutoční sa histopatologické vyšetrenie vybraných nervových tkanív.

▼B

1.5. POPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.5.1. **Príprava**

Náhodne sa vyberú mladé zdravé dospelé sliepky, ktoré netrpia vírovou chorobou a nie sú podrobené lekárskej terapii, ktoré by rušili pozorovania, a zaradia sa do testovanej a kontrolnej skupiny. Najmenej 5 dní pred začiatkom testovania sa aklimatizujú na laboratórne podmienky.

Použijú sa dostatočne veľké klietky alebo ohrady, aby umožňovali voľný pohyb sliepok a jednoduché pozorovanie chôdze.

Orálne dávkovanie testovanej látky sa bežne uskutočňuje pomocou žalúdočnej sondy, želatínových kapsúl alebo porovnateľným spôsobom. Kvapaliny sa dávkujú neriedené alebo rozpustené vo vhodnom nosiči (napríklad kukuričný olej); Pevné látky sa rozpustia, ak je to možné vzhľadom na veľkosť dávky, v želatínových kapsulách, čím nemusí byť zabezpečená účinná absorpcia. Toxické vlastnosti nevodných nosičov by mali byť známe a ak nie sú, musia byť pred testovaním stanovené.

1.5.2. **Podmienky testovania**

1.5.2.1. *Testované zvieratá*

Doporučujú sa mladé dospelé domáce sliepky *(Gallus gallus domesticus)* vo veku 8 až 12 mesiacov. Používa sa štandardná veľkosť chovov a pokolení a sliepky musia byť chované za podmienok umožňujúcich im voľný pohyb.

1.5.2.2. *Počet a pohlavie*

Okrem testovanej skupiny sa používa aj kontrolná skupina s nosičom aj pozitívna kontrolná skupina. Kontrolná skupina s nosičom je testovaná rovnako ako testovaná skupina s tým rozdielom, že sa im nepodáva testovaná látka.

Vhodný počet vtákov v každej skupine sa určí tak, že najmenej šesť jedincov môže byť usmrtených na biochemické stanovenia (tri v obidvoch časových bodoch) a šesť musí prežiť 21 dní pozorovacieho obdobia na patologické vyšetrenie.

Pozitívna kontrolná skupina sa sleduje súčasne alebo v nedávnej minulosti. Má obsahovať minimálne šesť sliepok, ktoré sú testované známym oneskorovacím neurotoxikantom. Tri sliepky sa použijú na biochemické stanovenia a tri na patologické vyšetrenie. Doporučuje sa periodické obnovovanie údajov z minulosti. Nové pozitívne kontrolné údaje sa získavajú vtedy, ak sa v testovacom laboratóriu zmení niektorá podstatná riadiaca zložka testu (pokolenie, potrava, podmienky ubytovania).

▼B

1.5.2.3. *Úrovne dávok*

Stanovenie úrovne dávky neskôr použitej v hlavnej štúdii sa uskutočňuje v predbežnej štúdii, pri ktorej sa používa vhodný počet sliepok a hladín. Väčšinou je v predbežnej štúdii nevyhnutné úmrtie, aby sa zistila postačujúca dávka pre hlavnú štúdiu. Zabrániť úmrtiu spôsobenému akútnym cholinergickým účinkom sa môže využitím atropínu alebo iných ochranných činidiel, o ktorých je známe, že rušivo nevplývajú na oneskorené neurotoxické reakcie. Na odhad maximálnej neletálnej dávky testovanej látky je k dispozícii množstvo testovacích metód (pozri metódu B.1 bis). Pri výbere dávky pomáhajú tiež údaje získané testovaním sliepok z minulosti a iné toxikologické informácie.

Dávka testovanej látky v hlavnej štúdii má byť tak vysoká ako je len možné, s ohľadom na výsledky výberu dávky predbežnej štúdie a najvyššiu limitnú dávku 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti. Možné úmrtie by nemalo rušivo vplývať s postačujúcim počtom prežitých zvierat na biochemické vyšetrenie (šesť) a histológiu (šesť) po 21 dňoch. Atropín alebo iné ochranné činidlá, o ktorých je známe, že rušivo nevplývajú na oneskorené neurotoxické reakcie, by mal byť použitý, aby sa predišlo úmrtiu testovaných zvierat v dôsledku akútneho cholinergického účinku.

1.5.2.4. *Limitný test*

Ak sa test na úrovni dávky 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň uskutočňuje použitím postupov popísaných v tejto štúdii a neboli pozorované žiadne toxické účinky, a ak sa neočakáva toxicita ani na základe údajov štruktúrne príbuzných zlúčenín, potom štúdia pri vyššej hladine nie je nevyhnutná. Výnimkou je prípad, keď expozícia človeka indikuje potrebnosť skúmania na vyššej hladine, a vtedy sa používa limitný test.

1.5.2.5. **Doba pozorovania**

Doba pozorovania je 21 dní.

1.5.3. **Postup**

Po použití ochranného činidla na zabránenie úmrtia v dôsledku akútneho cholinergického účinku sa podáva testovaná látka v jednej dávke.

1.5.3.1. Celkové pozorovania

Pozorovania začínajú ihneď po expozícii. Všetky sliepky sa starostlivo pozorujú niekoľkokrát počas prvých dvoch dní a potom najmenej raz denne počas 21 dní alebo do plánovaného usmrtenia. Všetky toxické príznaky sa zaznamenávajú, vrátane času nábehu, druhu, prudkosti a dĺžky trvania abnormalít správania. Ataxia sa meria v rádovej odstupňovanej mierke na najmenej štyroch úrovniach a sleduje sa paralýza. Najmenej dvakrát za týždeň sú sliepky určené na patologické vyšetrenie vybrané z klietok a podrobené cyklu vynútenej motorickej aktivity, ako je vyliezame po rebríku, s cieľom umožniť pozorovanie minimálnych toxických účinkov. Umierajúce zvieratá a zvieratá viditeľne trpiace alebo viditeľne pociťujúce bolesť sa odstránia, humánne usmrtia a prevedie sa ich pitva.

▼B

1.5.3.2. Telesná hmotnosť

Všetky sliepky sa vážia krátko pred podaním testovanej látky a najmenej každý týždeň potom.

1.5.3.3. Biochémia

Šesť sliepok náhodne vybraných z každej testovanej a kontrolnej skupiny s nosičom, a tri sliepky z pozitívnej kontrolnej skupiny (ak je táto skupina testovaná súčasne) sa usmrtí do niekoľkých dní po expozícii. Mozog a miecha sa pripravia a analyzujú na neuropatiu inhibície aktivity cieľovej esterázy. Naviac môžu byť použité na prípravu a analýzu neuropatie inhibície aktivity cieľovej esterázy sedacieho ischiatického nervového tkaniva. Normálne sa po 24 hodinách usmrtia tri sliepky kontrolnej a každej testovanej skupiny a tri po 48 hodinách, zatiaľ čo po 24 hodinách sa usmrtia tri sliepky pozitívnej kontrolnej skupiny. Ak pozorovania klinických príznakov intoxikácie (tie bývajú často zistené pozorovaním času nábehu cholinergických príznakov) naznačujú, že zvieratá sa toxického činidla zbavujú veľmi pomaly, potom sa uprednostňuje odoberanie vzoriek tkanív z troch vtákov po 24 a až 72 hodinách po podaní.

Pokiaľ sa usúdi, že to je potrebné, tieto vzorky sa používajú aj na analýzu acetylcholínesterázy (AchE). Spontánna reaktivácia AchE však môže nastať aj *in vivo*, čo vedie k podhodnoteniu potenciálu látky ako inhibítora AchE.

1.5.3.4. Makroskopická pitva

Pitva všetkých zvierat (plánovane usmrtených aj usmrtených z dôvodu umierania) zahŕňa pozorovanie vzhľadu mozgu a miechy.

1.5.3.5. Histopatologické vyšetrenie

Nervové tkanivo zo zvierat, ktoré prežili pozorovaciu periódu a neboli použité na biochemické štúdie, sa podrobí mikroskopickému vyšetreniu. Tkanivá musia byť fixované použitím premývacích metód *in situ*. Časti zahŕňajú mozoček (stredne pozdĺžna úroveň), predĺženú miechu, miechu, a periférne nervy. Časti miechy sa zoberú z horného krčného úseku, strednej hrudníkovej a bedrovokrížovej oblasti. Berú sa aj časti distálnej oblasti holenných nervov a ich vetvy vedúcich k dvojhlavému lýtkovému svalu a sedacie nervy. Sekcie sa zafarbia vhodným myelínom a axonovo určitými farbivami.

2. **ÚDAJE**

Negatívne výsledky vybraných parametrov tejto metódy (biochémia, histopatológia a pozorovanie správania) normálne nevyžadujú ďalšie testovanie na oneskorenú neurotoxicitu. Nejednoznačné alebo nepresvedčivé výsledky týchto parametrov si môžu vyžadovať ďalšie vyhodnotenie.

Musia sa zabezpečiť individuálne údaje. Naviac musia byť všetky údaje zhrnuté v tabuľkovej forme pre každú testovanú skupinu s počtom použitých zvierat na začiatku testu, počtom zvierat, u ktorých sa prejavili známky poškodenia, účinkov na správanie alebo biochemických účinkov, typy a prudkosť týchto poškodení alebo účinkov, percentuálne množstvo zvierat prejavujúcich jednotlivý typ a prudkosť poškodenia alebo účinku.

▼B

Nálezy pochádzajúce z tejto štúdie sa vyhodnotia z hľadiska rozsahu, intenzity a korelácie so správaním, biochemických a histopatologických účinkov, a ďalších pozorovaných účinkov u testovanej a kontrolnej skupiny.

Ak je to možné, numerické výsledky sa vyhodnotia vhodnou a všeobecne prijateľnou štatistickou metódou. Štatistická metóda sa vyberá počas plánovania štúdie.

3. **SPRÁVA**

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu má obsahovať, pokiaľ je to možné, nasledujúce informácie:

3.1. Testované zvieratá:

— použitý kmeň,

— počet a vek zvierat,

— zdroj, podmienky bývania, atď.,

— individuálne hmotnosti zvierat na začiatku testu.

3.2. Testovacie podmienky:

— podrobnosti o príprave testovanej látky, jej stabilite a homogenite, pokiaľ je to možné,

— zdôvodnenie výberu nosiča,

— podrobnosti o podávaní testovanej látky,

— podrobnosti o kvalite krmiva a pitnej vody,

— zdôvodnenie voľby výberu dávky,

— spresnenie podávaných dávok, vrátane podrobností o nosiči, objeme a fyzikálnej forme podávanej látky,

— totožnosť a podrobnosti o podávanom ochrannom činidle.

3.3. Výsledky:

— údaje o telesných hmotnostiach,

— toxické reakcie podľa úrovne dávky, vrátane úmrtnosti,

— povaha, intenzita a dĺžka trvania klinických pozorovaní (či boli reverzibilné alebo nie),

— podrobný opis biochemických metód a zistení,

— pitevné nálezy,

— podrobný popis všetkých histopatologických nálezov,

— štatistické spracovanie výsledkov, ak je vhodné.

Diskusia.

Záver.

4. **ODKAZY**

Táto metóda je obdobná OECD TG 418.

▼B

B.38. **ONESKORENÁ NEUROTOXICITA ORGANOFOSFOROVYCH LÁTOK PRI 28-DŇOVEJ ŠTÚDII OPAKOVANEJ DÁVKY**

1. **METODA**

1.1. ÚVOD

Pri stanovení a vyhodnotení toxických účinkov látok je dôležité zvážiť potenciál určitých kategórií látok spôsobujúcich určité druhy neurotoxicity, ktoré nemusia byť zistené v iných štúdiách toxicity. U určitých organofosforových látok sa zistilo, že spôsobujú oneskorenú neurotoxicitu a je nutné ich z tohto hľadiska hodnotiť.

Látky, ktoré môžu spôsobovať oneskorenú polyneuropatiu sa identifikujú pri použití screeningových testov *in vitro*; pravdaže, negatívne výsledky z *in vitro* štúdií neposkytujú dôkaz, že testovaná látka nie je neurotoxická.

28-dňový test oneskorenej neurotoxicity poskytuje informácie o možných zdravotných rizikách, pravdepodobne sa zvyšujúcich po opakovanej expozícii cez obmedzené časové obdobie. Test poskytuje informácie o odozve na dávku a môže tiež umožňovať odhad hodnoty nepozorovaných žiadnych nepriaznivých účinkov, na základe ktorej je možné stanoviť kritérium bezpečnosti expozície.

Pozri aj všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Organofosforové látky zahŕňajú nenabité organofosforové estery, tioestery alebo anhydridy organofosforečných, organofosfónových alebo organofosforamidových kyselín, alebo príbuzných tiolfosforových, tiónfosforových, tiolfosfónových, tiónfosfónových alebo fosforotioamidových kyselín, alebo iné látky spôsobujúce oneskorenú neurotoxicitu občas pozorovanú v tejto kategórie látok.

Oneskorená neurotoxicita je syndróm spájaný s predĺženým oneskorením nábehu ataxie, distálnej axonopatie v mieche a periférnom nervstve, a inhibíciou a starnutím neuropatiou postihnutej esterázy (NTE) v nervových tkanivách.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Denné dávky testovanej látky sa orálne podávajú sliepkam domácim počas 28 dní. Zvieratá sa pozorujú prinajmenšom denne a sledujú sa abnormality správania, ataxia a paralýza až do 14 dní po poslednej dávke: Biochemické merania a najmä inhibícia neuropatiou postihnutej esterázy (NTE) sa vykonávajú na náhodne vybraných sliepkach každej skupiny, bežne 24 a 48 hodín po podaní látky. Dva týždne po poslednej dávke sa zvyšok sliepok usmrtí a uskutoční sa histopatologické vyšetrenie vybraných nervových tkanív.

▼B

1.4. POPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Príprava**

Náhodne sa vyberú mladé zdravé dospelé sliepky, ktoré netrpia vírovou chorobou a nie sú podrobené lekárskej terapii, a bez abnormalít chôdze, čo by rušilo pozorovania, a zaradia sa do testovanej a kontrolnej skupiny. Najmenej 5 dní pred začiatkom testovania sa aklimatizujú na laboratórne podmienky.

Použijú sa dostatočne veľké klietky alebo výbehy, aby umožňovali voľný pohyb sliepok a jednoduché pozorovanie chôdze.

Orálne sa dávkuje každý deň, 7 dní do týždňa a uprednostňuje sa podávanie pomocou žalúdočnej sondy alebo želatínových kapsúl. Tekutiny sa dávkujú neriedené alebo rozpustené vo vhodnom nosiči (napríklad kukuričný olej). Pevné látky sa rozpustia, ak je to možné vzhľadom na veľkosť dávky, v želatínových tobolkách, čím nemusí byť zabezpečená účinná absorpcia. Toxické vlastnosti nevodných nosičov by mali byť známe a ak nie sú, musia byť pred testovaním stanovené.

1.4.2. **Podmienky testovania**

1.4.2.1. *Testované zvieratá*

Oporučujú sa mladé dospelé domáce sliepky (*Gallus gallus domesticus*) vo veku 8 až 12 mesiacov. Používa sa štandardná veľkosť chovov a pokolení a sliepky musia byť chované za podmienok umožňujúcich im voľný pohyb.

1.4.2.2. *Počet a pohlavie*

Všeobecne sa používajú najmenej tri testované skupiny a kontrolná skupina s nosičom. Kontrolná skupina s nosičom je testovaná rovnako ako testovaná skupina s tým rozdielom, že sa im nepodáva testovaná látka.

Vhodný počet sliepok v každej skupine sa určí tak, že najmenej šesť jedincov môže byť usmrtených na biochemické stanovenia (tri v obidvoch časových bodoch) a šesť musí prežiť 14 dní pozorovacieho obdobia na patologické vyšetrenie.

1.4.2.3. *Hladiny dávok*

Dávky sa vyberajú so zreteľom na tri výsledky získané pri akútnom teste oneskorenej neurotoxicity a ďalších prístupných údajov o toxicite alebo kinetike testovanej látky. Najvyššia dávka sa vyberá s cieľom indukovania toxických účinkov, pričom sa uprednostňuje oneskorená neurotoxicita, ale bez toho, aby spôsobovala uhynutie alebo očividné trápenie zvierat. Podľa toho sa vyberá zostupujúca postupnosť dávok so zámerom dokázať závislosť odozvy od dávky a pri najnižšej dávke dokázať aj hladinu, pri ktorej nebol pozorovaný žiadny nepriaznivý účinok.

▼B

1.4.2.4. *Limitný test*

Ak sa test na úrovni dávky 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň uskutočňuje použitím postupov popísaných v tejto štúdii a neboli pozorované žiadne toxické účinky, a ak sa neočakáva toxicita ani na základe údajov štruktúrne príbuzných zlúčenín, potom štúdia pri vyššej hladine nie je nevyhnutná. Výnimkou je prípad, ak expozícia človeka indikuje potrebnosť skúmania na vyššej hladine, a vtedy sa používa limitný test.

1.4.2.5. *Doba pozorovania*

Všetky zvieratá sa pozorujú prinajmenšom denne počas expozičného obdobia a 14 dní potom, s výnimkou plánovanej pitvy.

1.4.3. **Postup**

Zvieratám sa podáva testovaná látka sedem dní v týždni počas obdobia 28 dní.

1.4.3.1. *Celkové pozorovania*

Pozorovania začínajú ihneď po začatí expozície. Všetky sliepky sa starostlivo pozorujú prinajmenšom raz denne počas 28 dní a potom 14 dní alebo až do plánovaného usmrtenia. Všetky toxické príznaky sa zaznamenávajú, vrátane času nábehu, druhu, intenzity a dĺžky trvania príznakov. Do pozorovaní sa zahŕňa sledovanie abnormalít správania, ale aj ďalšie príznaky. Ataxia sa meria v rádovej odstupňovanej mierke na najmenej štyroch úrovniach a sleduje sa paralýza. Najmenej dvakrát za týždeň sú sliepky, určené na patologické vyšetrenie, vybrané z klietok a podrobené cyklu vynútenej motorickej aktivity, ako je vyliezanie po rebríku, s cieľom umožniť pozorovanie minimálnych toxických účinkov. Umierajúce zvieratá a zvieratá viditeľne trpiace alebo viditeľne pociťujúce bolesť sa odstránia, humánne usmrtia a prevedie sa ich pitva.

1.4.3.2. *Telesná hmotnosť*

Všetky sliepky sa zvážia krátko pred prvým podaním testovanej látky a najmenej každý týždeň potom.

1.4.3.3. *Biochémia*

Šesť sliepok náhodne vybraných z každej testovanej a kontrolnej skupiny s nosičom sa usmrtí do niekoľkých dní po poslednej dávke. Mozog a bedrová miecha sa pripravia a analyzujú na neuropatiu inhibície aktivity cieľovej esterázy (NTE). Naviac môžu byť použité na prípravu a analýzu neuropatie inhibície aktivity cieľovej esterázy sedacieho ischiatického nervového tkaniva na neuropatiu inhibície aktivity cieľovej esterázy (NTE). Normálne sa po 24 hodinách usmrtia tri sliepky kontrolnej a každej testovanej skupiny a tri po 48 hodinách po poslednej dávke. Ak údaje získané pri akútnej štúdii alebo pri iných štúdiach (napríklad toxikokinetiky) naznačujú, že je výhodnejší iný čas usmrtenia zvierat po podaní poslednej dávky, potom sa použije tento čas a zdôvodní sa.

Pokiaľ sa usúdi, že to je potrebné, tieto vzorky sa používajú aj na analýzu acetylcholínesterázy (AchE). Spontánna reaktivácia AchE však môže nastať aj *in vivo*, čo vedie k podhodnoteniu potenciálu látky ako inhibítora AchE.

▼B

1.4.3.4. *Makroskopická pitva*

Pitva všetkých zvierat (plánovane usmrtených aj usmrtených z dôvodu umierania) zahŕňa pozorovanie vzhľadu mozgu a miechy.

1.4.3.5. *Histopatologické vyšetrenie*

Nervové tkanivo zo zvierat, ktoré prežili pozorovaciu periódu a neboli použité na biochemické štúdie, sa podrobí mikroskopickému vyšetreniu. Tkanivá musia byť fixované použitím premývacích metód *in situ*. Časti zahŕňajú mozoček (stredne pozdĺžna úroveň), predĺženú miechu, miechu, a periférne nervy. Časti miechy sa odoberú z horného krčného úseku, strednej hrudníkovej a bedrovokrížovej oblasti. Odoberú sa aj časti distálnej oblasti holenných nervov a ich vetvy do dvojhlavých lýtkových svalov a sedacie ischiatické nervy. Sekcie sa zafarbia vhodným myelínom a axónovo určitými farbivami. Zo začiatku sa mikroskopické vyšetrenie uskutočňuje s konzervovanými tkanivami všetkých zvierat kontrolnej skupiny a skupiny testovanej pri vysokej dávke. Ak je mikroskopické vyšetrenie na prítomnosť účinkov pozitívne, uskutoční sa aj u sliepok zo skupín testovaných so strednou a nízkou dávkou.

2. **ÚDAJE**

Negatívne výsledky vybraných parametrov tejto metódy (biochémia, histopatológia a pozorovanie správania) normálne nevyžadujú ďalšie testovanie na oneskorenú neurotoxicitu. Nejednoznačné alebo nepresvedčivé výsledky týchto parametrov si môžu vyžadovať ďalšie vyhodnotenie.

Musia sa zabezpečiť individuálne údaje. Naviac musia byť všetky údaje zhrnuté v tabuľkovej forme pre každú testovanú skupinu s počtom použitých zvierat na začiatku testu, počtom zvierat, u ktorých sa prejavili známky poškodenia, účinkov na správanie alebo biochemických účinkov, typy a intenzitu týchto poškodení, alebo účinkov, a percentuálne množstvo zvierat vykazujúce jednotlivý typ a prudkosť poškodenia alebo účinku.

Nálezy pochádzajúce z tejto štúdie sa vyhodnotia z hľadiska rozsahu, intenzity a korelácie so správaním, biochemických a histopatologických účinkov, a ďalších pozorovaných účinkov u každej testovanej a kontrolnej skupiny.

Ak je to možné, číselné výsledky sa vyhodnotia vhodnou a všeobecne prijateľnou štatistickou metódou. Štatistická metóda sa vyberá počas plánovania štúdie.

3. **SPRÁVA**

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu má obsahovať, pokiaľ je to možné, nasledujúce informácie:

3.1. Testované zvieratá:

— použitý kmeň,

— počet a vek zvierat,

— zdroj, podmienky bývania, atď.,

— individuálne hmotnosti zvierat na začiatku testu.

▼B

3.2. Testovacie podmienky:

— podrobnosti o príprave testovanej látky, jej stabilite a homogenite, pokiaľ je to možné,

— zdôvodnenie výberu nosiča,

— podrobnosti o podávaní testovanej látky,

— podrobnosti o kvalite krmiva a pitnej vody,

— zdôvodnenie voľby výberu dávky,

— spresnenie podávaných dávok, vrátane podrobností o nosiči, objeme a fyzikálnej forme podávanej látky,

— zdôvodnenie voľby pre výber iných časov biochemického stanovenia ako je 24 a 48 hodín.

3.3. Výsledky:

— údaje o telesných hmotnostiach,

— toxické reakcie podľa úrovne dávky, vrátane úmrtnosti,

— hodnota nepozorovaných žiadnych nepriaznivých účinkov,

— povaha, intenzita a dĺžka trvania klinických pozorovaní (či boli reverzibilné alebo nie),

— podrobný opis biochemických metód a zistení,

— pitevné nálezy,

— podrobný opis všetkých histopatologických nálezov,

— štatistické spracovanie výsledkov, ak je vhodné.

Diskusia.

Záver.

4. **ODKAZY**

Táto metóda je obdobná OECD TG 419.

▼B

B.39. TEST NEPLÁNOVANEJ SYNTÉZY DNA (UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS – UDS) S PEČEŇOVÝMI BUNKAMI CICAVCOV *IN VIVO*

1. METODA

Táto metóda je obdobou OECD TG 486, testu neplánovanej syntézy DNA (Unscheduled DNA Synthesis – UDS) s pečeňovými bunkami cicavcov *in vivo* (1997).

1.1. ÚVOD

Účelom testu neplánovanej syntézy DNA (Unscheduled DNA Synthesis – UDS) s pečeňovými bunkami cicavcov *in vivo* je identifikovať testovacie látky, ktoré indukujú opravu DNA v pečeňových bunkách pokusných zvierat (1) (2) (3) (4).

Tento *in vivo* test poskytuje metódu na skúmanie genotoxických účinkov chemikálií v pečeni. Meraným parametrom je dôkaz poškodenia DNA a následná oprava v pečeňových bunkách. Pečeň je zvyčajne hlavným miestom metabolizmu absorbovaných zmesí. Poškodenia DNA je preto vhodné merať *in vivo*.

Ak existujú dôkazy, že testovacia látka nedosiahne cieľové tkanivo, nie je vhodné tento test použiť.

Koncový bod neplánovanej syntézy DNA (UDS) sa meria stanovením absorpcie označených nukleozidov v bunkách, ktoré neprechádzajú plánovanou (S-fáza) syntézou DNA. Najpoužívanejšou technikou je stanovenie absorpcie trítiom označeného tymidínu (^{3}H-TdR) autorádiografiou. Pre *in vivo* testy UDS sa používajú najmä krysie pečene. Použiť sa môžu aj iné ako pečeňové tkanivá, tie ale nie sú predmetom tejto metódy.

Zistenie UDS závisí od počtu báz DNA odstránených a nahradených na mieste poškodenia. Test UDS je preto osobitne hodnotný na zistenie „dlhej opravy“ (20–30 báz) indukovanej látkou. „Krátka oprava“ (jedna až tri bázy) sa naopak zisťuje s omnoho menšou citlivosťou. Z dôvodu neopravenia, nesprávnej opravy alebo nesprávnej replikácie lézií DNA môžu vzniknúť mutagénne udalosti. Rozsah reakcie UDS neposkytuje žiadny náznak kvality opravného procesu. Je ďalej možné, že mutagén reaguje s DNA, ale poškodenie DNA nie je opravené odstraňovacím opravným procesom. Nedostatok špecifických informácií o mutagénnej aktivite poskytnutý testom UDS je kompenzovaný potenciálnou citlivosťou tohto parametra, pretože sa meria na celom genóme.

Pozri tiež všeobecný úvod k časti B.

1.2. DEFINÍCIE

Opravované bunky: čisté jadrové vlákno (net nuclear grain – NNG) vyššie ako stanovená hodnota, adjustuje sa v laboratóriu vykonávajúcom test.

Čisté jadrové vlákno (net nuclear grain – NNG): kvantitatívny ukazovateľ aktivity UDS buniek pri autorádiografických testoch UDS vypočítaný odpočítaním priemerného počtu cytoplazmatických vlákien v cytoplazmatických oblastiach ekvivalentných jadru (CG) od počtu jadrových vlákien (NG): NNG = NG – CG. Počty NNG sa vypočítavajú pre jednotlivé bunky a potom spočítavajú pre bunky v kultúre, v paralelných kultúrach, atď.

▼B

Neplánovaná syntéza DNA (UDS): opravná syntéza DNA po odstránení časti DNA obsahujúcej oblasť poškodenia indukovaného chemickými látkami alebo fyzikálnymi činiteľmi.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Test UDS s pečeňovými bunkami cicavcov naznačuje opravnú syntézu DNA po odstránení časti DNA obsahujúcej oblasť poškodenia indukovaného chemickými látkami alebo fyzikálnymi činiteľmi. Test je zvyčajne založený na aplikácii ^{3}H-TdR do pečeňových buniek DNA, ktoré majú nízku frekvenciu buniek v S-fáze bunkového cyklu. Absorpcia ^{3}H-TdR sa zvyčajne stanovuje autorádiografiou, keďže táto metóda nie je tak citlivá na rušenie z buniek v S-fáze, ako napríklad počítanie kvapalnej scintilácie.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Prípravné práce**

1.4.1.1. *Výber živočíšnych druhov*

Bežne sa používajú krysy, hoci použiť sa dajú aj iné vhodné druhy cicavcov. Vyberajú sa bežne používané laboratórne kmene mladých zdravých dospelých zvierat. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variácia zvierat minimálna a nemala by presiahnuť ± 20 % strednej hmotnosti každého pohlavia.

1.4.1.2. *Podmienky umiestnenia a kŕmenia*

Používajú sa všeobecné podmienky uvedené vo všeobecnom úvode k časti B, cieľovou hodnotou vlhkosti je 50 % až 60 %.

1.4.1.3. *Príprava zvierat*

Zdravé, mladé, dospelé zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Klietky sú umiestnené tak, aby sa minimalizovali možné účinky vyplývajúce z rozmiestnenia klietok. Zvieratá sa jednotlivo označia. Zvieratá sa aklimatizujú na laboratórne podmienky najmenej päť dní pred začatím štúdie.

1.4.1.4. *Príprava dávok*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú a ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je potrebné, rozrieďujú sa pred podávaním dávok zvieratám. Kvapalné testovacie látky sa podávajú priamo, alebo rozriedené pred podávaním. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na vhodnosť uskladnenia.

1.4.2. **Podmienky testov**

1.4.2.1. *Rozpúšťadlo/nosič*

Rozpúšťadlo/nosič by nemali vyvolávať toxické účinky v používaných úrovniach dávok a nemali by chemicky reagovať s testovacou látkou. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by malo byť podporené údajmi označujúcimi ich kompatibilitu. Odporúča sa zvážiť, kedykoľvek je to možné, použitie vodného rozpúšťadla/nosiča.

▼B

1.4.2.2. *Kontrolné skupiny*

Pri každej nezávisle uskutočňovanej časti pokusu sa vytvoria pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo/nosič) kontrolné skupiny. Okrem podania testovacej látky sa so zvieratami v kontrolných skupinách zaobchádza rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami.

Pozitívnym kontrolným skupinám sa podávajú látky, u ktorých je známa tvorba UDS pri podaní na úrovni expozície, pri ktorej sa očakáva zistiteľný nárast proti pozadiu. Pozitívne kontrolné skupiny vyžadujúce metabolickú aktiváciu sa používajú pri dávkach vyvolávajúcich mierne reakcie (4). Dávky sa volia tak, aby boli účinky zjavné, ale aby pozorovateľovi priamo neodhaľovali identitu kódovaných vzoriek. Príklady látok pre pozitívne kontrolné skupiny:

Odber vzorky	Latka	č. CAS	č. EINECS
skorý odber (2–4 hodiny)	N-nitrozodimetylamín	62-75-9	200-249-8
neskorý odber (12–16 hodin)	N-2-fluorenylacetamid (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Pre pozitívne kontrolné skupiny sa môžu použiť aj iné vhodné látky. Je prijateľné, aby pozitívnym kontrolným skupinám boli látky podávané spôsobom odlišným od testovacej látky.

1.5. POSTUP

1.5.1. **Počet a pohlavie zvierat**

Používa sa primeraný počet zvierat tak, aby bola zohľadnená prirodzená biologická variácia pri reakcii na test. Počet zvierat činí najmenej tri analyzovateľné zvieratá na skupinu. Ak existujú dostatočné historické údaje, pre súčasné negatívne a pozitívne kontrolné skupiny sa vyžaduje jedno alebo dve zvieratá.

Ak v čase uskutočnenia štúdie sú dostupné údaje zo štúdií rovnakých druhov používajúce rovnaké spôsoby expozície, ktoré ukazujú, že neexistujú významné rozdiely v toxicite medzi pohlaviami, postačuje aj testovanie jedného pohlavia, najlepšie samcov. Ak je expozícia chemikálií na ľudí závislá od pohlavia, ako napríklad pri niektorých farmaceutických prípravkoch, test sa uskutoční na zvieratách príslušného pohlavia.

1.5.2. **Harmonogram ošetrovania**

Testovacie látky sa podávajú jedenkrát.

1.5.3. **Úrovne dávok**

Zvyčajne sa používajú minimálne dve úrovne dávok. Najvyššia dávka sa definuje ako známky toxicity z dávky na takej úrovni, že vyššie úrovne dávok založené na rovnakom dávkovacom režime by pravdepodobne spôsobili úmrtnosť. Vo všeobecnosti by najnižšia dávka mala byť 50 % až 25 % najvyššej dávky.

▼B

Látky so špecifickými biologickými aktivitami pri nízkych netoxických dávkach (ako napríklad hormóny a mitogény) môžu byť výnimkou kritéria stanovenia dávky a hodnotia sa z prípadu na prípad. Ak sa z dôvodu nedostatku vhodných údajov uskutoční štúdia na zistenie rozsahu, vykoná sa v rovnakom laboratóriu, za použitia rovnakého druhu, rodu, pohlavia a dávkovacieho režimu ako v hlavnej štúdii.

Najvyššia dávka sa definuje ako dávka, ktorá spôsobuje známky toxicity v pečeni (napríklad: pyknotické jadrá).

1.5.4. **Limitný test**

Ak test pri jednej úrovni dávky najmenej 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti pri jednom podaní alebo pri dvoch podaniach v jeden deň nevyvoláva žiadne toxické účinky a ak sa neočakáva genotoxicita na základe údajov zo štrukturálne príbuzných látok, úplná štúdia pri použití troch hladín dávkovania sa nepovažuje za potrebnú. Očakávaná expozícia na ľudí môže naznačovať potrebu vyššej úrovne dávky pri použití limitného testu.

1.5.5. **Podávanie dávok**

Testovacia látka sa zvyčajne podáva plnením žalúdka sondou s použitím žalúdočnej rúrky alebo vhodnej intubačnej kanyly alebo intraperitoneálnou injekciou. Iné spôsoby expozície sú prijateľné len so zdôvodnením. Intraperitoneálna cesta sa však neodporúča, pretože pečeň by mohla byť vystavená testovacej látke priamo a nie prostredníctvom obehového systému. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže naraz podávať sondou alebo injekciou závisí od veľkosti testovacieho zvieraťa. Objem by nemal presiahnuť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Použitie objemov vyšších ako tento sa musí zdôvodniť. Okrem dráždivých alebo žieravých látok, ktoré bežne odhalia zhoršené účinky s vyššími koncentráciami, sa variabilita testovacieho objemu minimalizuje upravením koncentrácie na zabezpečenie stáleho objemu na všetkých úrovniach dávok.

1.5.6. **Príprava pečeňových buniek**

Pečeňové bunky sa pripravujú z pokusných zvierat zvyčajne po 12 až 16 hodinách od podania. Vo všeobecnosti je potrebný aj ďalší odber vzorky (zvyčajne po dvoch až štyroch hodinách od podania dávky), pokiaľ neexistuje jasná pozitívna reakcia po 12 až 16 hodinách. Odber vzoriek sa môže uskutočniť aj v inom čase, ak je to zdôvodnené na základe toxikokinetických údajov.

Krátkodobé kultúry pečeňových buniek cicavcov sa zvyčajne tvoria perfúzovaním pečene in situ kolagenázou a umožnením čerstvo oddelených pečeňových buniek zachytiť sa na vhodnom povrchu. Pečeňové bunky z negatívnych kontrolných skupín zvierat by mali mať životaschopnosť (5) najmenej 50 %.

1.5.7. **Stanovenie UDS**

Čerstvo izolované pečeňové bunky cicavcov sa inkubujú s médiom obsahujúcim ^{3}H-TdR primerane dlho, napríklad: tri až osem hodín. Na konci inkubačnej doby sa oddelí médium od buniek, pričom tieto môžu byť inkubované s médiom obsahujúcim nadbytočný neoznačený tymidín na zníženie neprirodzenej rádioaktivity („studený lov“). Bunky sa následne očistia, fixujú a nechajú vysušiť. Pri dlhších inkubačných časoch nie je studený lov potrebný. Sklíčka sa namočia do autorádiografickej emulzie, vystavia do tmy (napríklad: pri chladení počas 7 až 14 dní), vyvolajú, zafarbia a následne sa spočítajú exponované striebristé vlákna. Z každého zvieraťa sa pripravujú dve až tri sklíčka.

▼B

1.5.8. **Analýza**

Sklíčka obsahujú dostatočný počet buniek s normálnou morfológiou na umožnenie cieleného hodnotenia UDS. Preparáty sa mikroskopicky skúmajú na známky otvorenej cytotoxicity (napríklad: pyknóza, znížené hodnoty včlenenia rádioaktívnych alebo ťažkých izotopov).

Sklíčka sa pred rátaním vlákien označia kódmi. Z každého zvieraťa sa z minimálne dvoch sklíčok hodnotí 100 buniek; hodnotenie menej ako 100 buniek/zviera sa zdôvodní. Počty vlákien sa nehodnotia na S-fázové jadrá, avšak je možné zaznamenať podiel S-fázových buniek.

Množstvo aplikovaného ^{3}H-TdR do jadra a cytoplazmy morfologicky normálnych buniek podľa rozloženia striebristých vlákien sa stanovuje vhodnou metódou.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Uvádzajú sa údaje za každé zviera a sklíčko. údaje o jednotlivých zvieratách sa uvádzajú v tabuľkovej forme. Počet čistých jadrových vlákien (NNG) sa vypočítava pre každú bunku, pre každé zviera a pre každú dávku a čas odpočítaním počtu CG od počtu NG. Ak sa počítajú „opravované bunky“, kritériá pre definovanie „opravovaných buniek“ sa zdôvodnia a založia na historických alebo súčasných údajoch o negatívnych kontrolných skupinách. Numerické výsledky sa môžu hodnotiť štatistickými metódami. Ak sa použijú štatistické testy, vyberajú sa a zdôvodňujú pred uskutočnením štúdie.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Príklady kritérií pre pozitívne/negatívne reakcie zahŕňajú:

pozitívne	i)	hodnoty NNG nad stanovenou hranicou, ktorá je zdôvodnená na základe laboratórnych historických údajov,
alebo	ii)	hodnoty NNG oveľa vyššie ako hodnoty súčasnej kontrolnej skupiny;
negatívne	i)	hodnoty NNG v rámci/pod historickou prahovou hodnotou kontrolnej skupiny
alebo	ii)	hodnoty NNG nie oveľa vyššie ako hodnoty súčasnej kontrolnej skupiny.

▼B

Zvažuje sa biologická relevantnosť výsledkov, t. j. do úvahy sa berú parametre ako variácia medzi zvieratami, vzťah medzi dávkou a reakciou a cytotoxicita. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy. Štatistický význam nie je jediným určujúcim faktorom pre pozitívnu reakciu.

Hoci väčšina pokusov poskytne jasne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch údaje vopred vylúčia jednoznačné posúdenie aktivity testovacej látky. Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybniteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

Pozitívne výsledky testu UDS s pečeňovými bunkami cicavcov *in vivo* naznačujú, že testovacia látka vyvoláva poškodenie DNA v pečeňových bunkách *in vivo*, ktoré sa dajú opraviť neplánovanou syntézou DNA *in vitro*. Negatívne výsledky naznačujú, že v testovacích podmienkach testovacia látka neindukuje poškodenie DNA zistiteľné týmto testom.

Mala by sa prediskutovať pravdepodobnosť, že testovacia látka dosiahne všeobecnú obehovú sústavu alebo špecificky cieľové tkanivo (napríklad: systémová toxicita).

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu zahŕňa nasledovné informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

— zdôvodnenie voľby nosiča,

— rozpustnosť a stabilita testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Testovacie zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky chovu, strava atď.,

— individuálna hmotnosť zvierat na začiatku testu, vrátane rozsahu telesnej hmotnosti, strednej hodnoty a štandardnej odchýlky pre každú skupinu.

Podmienky testov:

— pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo/nosič) kontrolné skupiny,

— údaje zo štúdie na zistenie rozsahu, ak bola uskutočnená,

— zdôvodnenie voľby úrovne dávok,

— podrobnosti o príprave testovacej látky,

— podrobnosti o podávaní testovacej látky,

— zdôvodnenie voľby spôsobu podávania,

— metódy overenia, že testovacia látka dosiahla všeobecnú obehovú sústavu alebo cieľové tkanivo, ak je to vhodné,

▼B

— konverzia z koncentrácie testovacej látky v strave/vode (ppm) na samotnú dávku (mg/kg/telesná hmotnosť/deň), ak je to vhodné,

— podrobnosti o kvalite stravy a vody,

— podrobný opis harmonogramu podávania a odberu vzoriek,

— metódy merania toxicity,

— metóda prípravy pečeňových buniek a kultúr,

— použitá autorádiografická technika,

— počet pripravených sklíčok a počet hodnotených buniek,

— hodnotiace kritériá,

— kritériá hodnotenia pokusov ako pozitívne, negatívne alebo nejasné.

Výsledky:

— stredné hodnoty jadrových vlákien, cytoplazmatických vlákien a čistých jadrových vlákien podľa jednotlivých sklíčok, zvierat a skupín,

— vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je to možné,

— štatistické analýzy, ak boli použité,

— známky toxicity,

— súčasné údaje o negatívnych (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnych kontrolných skupinách,

— historické údaje o negatívnych (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnych kontrolných skupinách s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami,

— počet „opravovaných buniek“, ak bol stanovený,

— počet buniek v S-fáze, ak bol stanovený,

— životaschopnosť buniek.

Rozbor výsledkov.

Závery.

4. **LITERATÚRA**

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, 1 – 18.

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, 123 – 133.

Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I. de G. (1993). In Vivo Rat Liver UDS Assay. In: Kirkland D.J. and Fox M., (Eds) Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52 – 77.

▼B

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, 263 – 285.

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, 21 – 27.

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, 553 – 562.

▼M8

B.40. **POLEPTANIE KOŽE *IN VITRO*: TESTOVACIA METÓDA POMOCOU TRANSKUTÁNNEHO ELEKTRICKÉHO ODPORU (TER)**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda (ďalej len „TM“) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (ďalej len „TG“) 430 (2015). Poleptanie kože je vznik nevratného poškodenia kože, ktoré sa prejavuje ako viditeľná nekróza cez epidermu až do dermy po aplikácii testovanej chemikálie [v znení definície podľa Globálneho harmonizovaného systému klasifikácie a označovania chemických látok (GHS) Organizácie Spojených národov (OSN) (1) a nariadenia Európskej únie (EÚ) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (CLP) ([1])]. Touto aktualizovanou testovacou metódou B.40 sa stanovuje postup *in vitro*, ktorý umožňuje identifikáciu nežieravých a žieravých látok a zmesí v súlade s GHS OSN (1) a CLP.

2. Posudzovanie poleptania kože zvyčajne zahŕňalo použitie laboratórnych zvierat (TM B.4, ekvivalent OECD TG 404 pôvodne prijatého v roku 1981 a revidovaného v rokoch 1992, 2002 a 2015) (2). Dodatočne k súčasnej testovacej metóde B.40 sa validovali a prijali dve ďalšie testovacie metódy *in vitro* na testovanie žieravých vlastností chemikálií pre kožu – TM B.40a (ekvivalent usmernenia OECD TG 431) (3) a TM B.65 (ekvivalent usmernenia OECD TG 435) (4), ktorými je tiež v prípade potreby možné určiť podkategórie žieravých chemikálií. Na testovanie poleptania kože sa prijalo niekoľko validovaných testovacích metód *in vitro* ako TM B.46 (ekvivalent usmernenia OECD TG 439) (5). V usmerňovacom dokumente OECD o integrovaných prístupoch k testovaniu a hodnoteniu (IATA) v prípade poleptania a podráždenia kože sa opisuje viacero modulov, v ktorých sú zoskupené rôzne zdroje informácií a analytické nástroje, a poskytuje sa usmernenie o tom, i) ako integrovať a používať existujúce údaje z testovania, ako aj údaje nepochádzajúce z testovania na posúdenie dráždivých a žieravých vlastností chemikálií pre kožu, a ii) navrhuje sa prístup v prípade potreby ďalšieho testovania (6).

3. Táto testovacia metóda sa týka koncového sledovaného parametra poleptania kože pre ľudské zdravie. Je založená na testovacej metóde pomocou transkutánneho elektrického odporu (TER) na potkanej koži, pri ktorej sa žieraviny na kožných terčíkoch identifikujú ich schopnosťou spôsobiť stratu normálnej integrity a ochrannej funkcie *stratum corneum*. Príslušné usmernenie OECD na vykonávanie testov sa pôvodne prijalo v roku 2004, pričom v roku 2015 sa aktualizovalo s cieľom odkázať na usmerňovací dokument IATA.

4. Na posúdenie testovania poleptania kože *in vitro* sa na regulačné účely vykonali prevalidačné štúdie (7), po ktorých nasledovala riadna validačná štúdia testovacej metódy TER na potkanej koži na posúdenie poleptania kože (8) (9) (10) (11). Výsledky týchto štúdií viedli k odporúčaniu, že

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006, Ú. v. EÚ L 353/1, 31.12.2008.

▼M8

testovacia metóda TER (označená ako validovaná referenčná metóda alebo VRM) by sa na regulačné účely mohla používať pri posudzovaní poleptania kože *in vivo* (12) (13) (14).

5. Pred tým, ako sa na regulačné účely môže použiť navrhovaná podobná alebo upravená testovacia metóda TER *in vitro* na poleptanie kože, ktorá je iná ako validovaná referenčná metóda, mala by sa stanoviť jej spoľahlivosť, relevantnosť (presnosť) a obmedzenia jej navrhovaného používania, aby sa zabezpečila podobnosť s validovanými referenčnými metódami podľa výkonnostných noriem (PS) (15). Vzájomné uznávanie údajov OECD je možné zaručiť len po tom, ako sa každá navrhovaná nová alebo aktualizovaná testovacia metóda na základe noriem výkonnosti preskúma a zaradí do príslušného usmernenia OECD na vykonávanie testov.

VYMEDZENIE POJMOV

6. Vymedzenie použitých pojmov sa uvádza v dodatku.

POČIATOČNÉ ÚVAHY

7. Z validačnej štúdie (10) a ďalších publikovaných štúdií (16) (17) vyplýva, že testovacou metódou TER na potkanej koži je možné rozlíšiť medzi známymi látkami so žieravými účinkami na kožu a látkami, ktoré nemajú žieravé účinky, s celkovou citlivosťou 94 % (51/54) a špecifickosťou 71 % (48/68) v prípade databázy so 122 látkami.

8. Predmetom tejto testovacej metódy sú poleptania kože *in vitro*. Umožňuje sa ňou identifikácia nežieravých a žieravých testovaných chemikálií v súlade s GHS OSN/CLP. Obmedzením tejto testovacej metódy, ako sa preukázalo vo validačných štúdiách (8) (9) (10) (11), je, že neumožňuje podkategorizáciu žieravých látok a zmesí v súlade s GHS OSN/CLP. Spôsob použitia tejto testovacej metódy sa určí uplatniteľným regulačným rámcom. Keďže táto testovacia metóda neposkytuje dostatočné informácie o podráždení kože, treba poznamenať, že TM B.46 sa špecificky zameriava na zdravotný účinok podráždenia kože *in vitro* (5). Na úplné vyhodnotenie lokálnych účinkov na kožu po jednorazovej expozícii kože by sa mal použiť usmerňovací dokument OECD o IATA (6).

9. V rámci validácie, ktorá je základom tejto testovacej metódy, bol otestovaný celý rad chemikálií, ktoré predstavovali najmä látky, a empirická databáza validačnej štúdie obsahovala celkovo 60 látok, ktoré pokrývali širokú škálu chemických tried (8) (9). Na základe celkových dostupných údajov je daná metóda testovania uplatniteľná na širokú škálu chemických tried a fyzikálnych stavov vrátane kvapalín, polotuhých látok, tuhých látok a voskov. Treba poznamenať, že počas validácie sa posudzoval porovnateľne malý počet voskov a tuhých žieravých látok, keďže pre špecifické fyzikálne stavy nie sú v súčasnosti k dispozícii testovacie predmety s vhodnými referenčnými údajmi. Kvapaliny môžu byť vodné alebo nevodné; tuhé látky môžu byť rozpustné alebo nerozpustné vo vode. V prípade, že existujú dôkazy o nepoužiteľnosti tejto testovacej metódy na špecifickú kategóriu látok, nemala by sa táto testovacia metóda pri tejto špecifickej kategórii použiť. Táto testovacia metóda sa považuje za aplikovateľnú nielen na látky, ale aj v prípade zmesí. Vzhľadom na skutočnosť, že zmesi zahŕňajú široké spektrum kategórií a zloženia, a v súčasnosti sú dostupné iba obmedzené informácie o testovaní zmesí, v prípadoch, kde možno preukázať dôkazy o nepoužiteľnosti testovacej metódy pre špecifickú kategóriu zmesí (napr. na základe stratégie navrhovanej Eskesom *et al.*, 2012) (18), testovacia metóda by sa nemala používať pri danej špecifickej kategórii zmesí. Pred použitím tejto testovacej metódy na zmesi s cieľom generovať údaje plánované na regulačné účely by sa malo zvážiť, či môže na tento účel poskytnúť

▼M8

adekvátne výsledky, a ak áno, tak prečo. Takéto úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi. Plyny a aerosóly ešte neboli posúdené vo validačných štúdiách (8) (9). Aj keď je možné, že tieto látky sa môžu testovať testovacou metódou TER, súčasná testovacia metóda neumožňuje testovanie plynov a aerosólov.

PRINCÍP TESTU

10. Testovaná chemikália sa aplikuje v trvaní do 24 hodín na epidermálny povrch kožných terčíkov v dvojkomorovom testovacom systéme, v ktorom tieto kožné terčíky majú funkciu deliacej steny medzi komorami. Kožné terčíky sa odoberú z potkanov vo veku 28 až 30 dní, ktoré boli usmrtené humánnym spôsobom. Žieravé chemikálie sa identifikujú ich schopnosťou spôsobiť stratu normálnej integrity a bariérnej funkcie rohovitej vrstvy (*stratum corneum*), čo sa pri meraní prejavuje ako zníženie TER pod prahovú úroveň (16) (pozri odsek 32). Na základe rozsiahlych údajov širokej škály látok, v prípade ktorých veľká väčšina hodnôt bola jednoznačne výrazne nad (často > 10 kΩ) alebo výrazne pod (často < 3 kΩ) touto hodnotou, sa pre TER na potkanej koži zvolila medzná hodnota 5 kΩ (16). Vo všeobecnosti chemikálie, ktoré nie sú u zvierat žieravé, ale sú dráždivé alebo nedráždivé, neznižujú TER pod túto medznú hodnotu. Použitie iných kožných prípravkov alebo iného vybavenia môže zmeniť medznú hodnotu, čo si vyžaduje ďalšiu validáciu.

11. Do testovacieho postupu je na potvrdenie pozitívnych výsledkov testovania TER vrátane hodnôt okolo 5 kΩ zaradený krok na stanovenie viazania farbiva. Krokom viazania farbiva sa stanovuje, či zvýšenie permeability iónov nastáva v dôsledku fyzického porušenia rohovitej vrstvy (*stratum corneum*). Ukázalo sa, že metóda TER používajúca potkaniu kožu umožňuje predvídať výsledky zisťovania žieravosti *in vivo* s králikmi podľa testovacej metódy B.4 (2).

PREUKAZOVANIE SPÔSOBILOSTI

12. Pred rutinným použitím testovacej metódy TER na potkanej koži, ktoré zodpovedá požiadavkám tejto testovacej metódy, by mali laboratóriá preukázať technickú spôsobilosť správnou klasifikáciou dvanástich chemikálií na preukázanie spôsobilosti odporúčaných v tabuľke 1. V prípadoch, keď uvedená látka nie je k dispozícii alebo keď je to odôvodniteľné, možno použiť inú látku, pri ktorej sú k dispozícii primerané referenčné údaje *in vivo* a *in vitro* [napríklad zo zoznamu referenčných chemikálií (16)], za predpokladu, že sa uplatnia rovnaké kritériá výberu, ktoré sú opísané v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Zoznam chemikálií na preukázanie spôsobilosti [1]

Látka	CASRN	Chemická trieda [2]	GHS OSN/ CLP Kat. založená na výsledkoch *in vivo* [3]	VRM Kat. založená na výsledkoch *in vitro*	Fyzikálny stav	pH [4]
Žieravé látky *in vivo*						
N,N'-dimetyl dipropyléntriamín	10563-29-8	organická báza	1A	6 × C	L	8,3
propán-l,2-diamín	78-90-0	organická báza	1A	6 × C	L	8,3

▼**M8**

Látka	CASRN	Chemická trieda ([2])	GHS OSN/CLP Kat. založená na výsledkoch *in vivo* ([3])	VRM Kat. založená na výsledkoch *in vitro*	Fyzikálny stav	pH ([4])
Žieravé látky *in vivo*						
kyselina sírová (10 %)	7664-93-9	anorganická kyselina	(1A/)1B/1C	5 × C 1 × NC	L	1,2
hydroxid draselný (10 % vodný roztok)	1310-58-3	organická báza	(1A/)1B/1C	6 × C	L	13,2
kyselina oktánová (kaprylová)	124-07-2	organická kyselina	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,6
2-terc-butylfenol	88-18-6	fenol	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,9
Nežieravé látky *in vivo*						
kyselina izostearová	2724-58-5	organická kyselina	NC	6 × NC	L	3,6
4H-1,2,4-triazoM-ylamín	584-13-4	organická báza	NC	6 × NC	S	5,5
fenetylbromid	103-63-9	elektrofil	NC	6 × NC	L	3,6
4-(metylsulfanyl)benzaldehyd	3446-89-7	elektrofil	NC	6 × NC	L	6,8
deka-1,9-dién	1647-16-1	neutrálna organická látka	NC	6 × NC	L	3,9
tetrachlóretylén	127-18-4	neutrálna organická látka	NC	6 × NC	L	4,5

Skratky: aq = vodné; CASRN = registračné číslo CAS (CAS číslo, Chemical Abstracts Service Registry Number); VRM = validovaná referenčná metóda; C = žieravá látka; NC = nežieravá látka.

([1]) Látky na preukázanie spôsobilosti, rozdelené najprv podľa toho, či ide o žieravé alebo nežieravé látky, potom podľa podkategórie žieravých látok a následne podľa chemickej triedy, boli vybraté spomedzi látok použitých vo validačných štúdiách ECVAM testovacou metódou TER na potkanej koži (8) (9). Pokiaľ to nebolo uvedené inak, látky boli testované na úrovni čistoty získanej pri nákupe z komerčného zdroja (8). Výber v najvyššej možnej miere zahŕňa látky, ktoré: i) sú reprezentatívne z hľadiska rozsahu žieravých účinkov (napr. nežieravé; slabé až silné žieraviny), ktoré je možné zmerať alebo predvídať prostredníctvom validovanej referenčnej metódy; ii) sú reprezentatívne z hľadiska chemických tried použitých vo validačných štúdiách; iii) odrážajú vlastnosti výkonnosti validovanej referenčnej metódy; iv) majú dobre definované chemické štruktúry; v) pri referenčnej testovacej metóde *in vivo* vyvolávajú konečné výsledky; vi) sú komerčne dostupné a vii) nie sú s nimi spojené neúmerné náklady na zneškodnenie.

([2]) Chemická trieda pridelená podľa Barratt *et al.* (8).

([3]) Zodpovedajúce skupiny obalov OSN sú I, II a III (v danom poradí) pre kategórie GHS OSN/CLP 1A, 1B a 1C.

([4]) Hodnoty pH získané z publikácií Fentem *et al.* (9) a Barratt *et al.* (8).

▼M8

POSTUP

13. K dispozícii sú štandardné operačné postupy (SOP) pre testovaciu metódu poleptania kože TER na potkanej koži (19). Testovacia metóda TER na potkanej koži, na ktorú sa vzťahuje táto testovacia metóda, by mala byť v súlade s týmto podmienkami:

Zvieratá

14. Mali by sa používať potkany, pretože citlivosť ich kože na látky tejto testovacej metódy už bola preukázaná (12) a sú jediným zdrojom kože, ktorý bol formálne validovaný (8) (9). Vek (v čase odberu kože) a kmeň potkanov sú osobitne dôležité na zabezpečenie toho, aby folikuly chlpov boli v latentnej fáze, predtým než sa začne rast zrelej srsti.

15. Chrbtová a bočná srsť mladých, približne 22-denných samcov alebo samíc potkanov (z kmeňa príbuzného Wistaru alebo porovnateľného kmeňa) sa opatrne odstráni malými nožnicami. Zvieratá sa následne umyjú opatrným utieraním, pričom sa ostrihaná oblasť ponorí do antibiotického roztoku (obsahujúceho napríklad streptomycín, penicilín, chloramfenikol a amfotericín v koncentráciách účinne inhibujúcich rast baktérií). Zvieratá sa na tretí alebo štvrtý deň po prvom omytí znova omyjú antibiotikami a použijú sa do troch dní od druhého omytia, keď sa rohovitá vrstva (*stratum corneum*) po odstránení srsti zregeneruje.

Príprava kožných terčíkov

16. Zvieratá sa humánne usmrcujú vo veku 28 až 30 dní, presný vek má rozhodujúci význam. Z každého zvieraťa sa potom odstráni dorzolaterálna koža, ktorá sa opatrne zbaví nadbytočného podkožného tuku. Odoberú sa kožné terčíky, z ktorých každý má priemer približne 20 mm. Koža sa pred použitím terčíkov môže uchovávať, ak sa preukáže, že údaje z pozitívnych a negatívnych kontrol sú rovnocenné s tými, ktoré sa získali s čerstvou kožou.

17. Každý kožný terčík sa preloží cez jeden z koncov trubice z PTFE (polytetrafluóretylén) tak, aby epidermálny povrch bol v kontakte trubicou. Cez koniec trubice sa natesno prevlečie gumený tesniaci krúžok, aby sa koža nepohybovala, a nadbytočné tkanivo sa oreže. Gumený tesniaci krúžok sa potom opatrne utesní na koniec trubice z PTFE vazelínou. Trubica sa v receptorovej komore obsahujúcej roztok $MgSO_4$ (154 mM) pridržiava pružinovou svorkou (obrázok 1). Kožný terčík by sa mal úplne ponoriť do roztoku $MgSO_4$. Z jednej kože potkana možno získať 10 až 15 kožných terčíkov. Rozmery trubice a tesniaceho krúžku sú uvedené na obrázku 2.

18. Pred začatím testovania sa na účely postupu kontroly kvality odmeria TER dvoch kožných terčíkov na každú kožu zvieraťa. Ak sa pri tejto testovacej metóde majú použiť zostávajúce terčíky, v prípade obidvoch terčíkov by mala byť nameraná hodnota elektrického odporu väčšia ako 10 kΩ. Ak je hodnota odporu nižšia ako 10 kΩ, zvyšné terčíky z danej kože by sa mali z testov vyradiť.

Aplikácia testovanej chemikálie a kontrolných látok

19. Pre každý testovací cyklus (pre každý pokus) by sa mali súbežne použiť pozitívne a negatívne kontroly, aby sa zaručila primeraná účinnosť daného experimentálneho modelu. V každom testovacom cykle (pri každom pokuse) by sa mali použiť kožné terčíky z jedného zvieraťa. Navrhovanými chemikáliami pre pozitívnu kontrolu je 10 M kyselina chlorovodíková a pre negatívnu kontrolu destilovaná voda.

▼M8

20. Na epidermálny povrch vo vnútri trubice sa rovnomerne aplikujú tekuté testované chemikálie (150 µl). Pri testovaní tuhých materiálov sa na terčík rovnomerne aplikuje dostatočné množstvo tuhej látky, aby bol pokrytý celý povrch epidermy. Na tuhú látku sa pridá deionizovaná voda (150 µl) a trubica sa jemne pretrepe. S cieľom dosiahnuť maximálny styk s kožou môže byť potrebné zohriať tuhé látky na 30 °C, aby sa testovaná chemikália roztavila alebo zmäkla, alebo ju treba pomlieť na granulát alebo prášok.

21. Pre každú testovanú a kontrolnú chemikáliu sa v každom testovacom cykle (pri každom pokuse) použijú tri kožné terčíky. Testované chemikálie sa aplikujú 24 hodín pri teplote 20 – 23 °C. Testovaná chemikália sa odstráni omytím prúdom vody z vodovodu izbovej teploty, kým sa nedá odstrániť žiaden ďalší materiál.

Merania TER

22. Impedancia kože sa meria ako TER s použitím Wheatstonovho mostíka so striedavým prúdom nízkeho napätia (18). Všeobecné špecifikácie mostíka sú: 1 – 3 volty prevádzkového napätia, sínusový alebo pravouhlý tvar kmitov striedavého prúdu s frekvenciou 50 – 1 000 Hz a rozsah merania minimálne 0,1 – 30 kΩ. Merací mostík použitý vo validačnej štúdii meria induktanciu, kapacitanciu a odpor až do hodnôt 2 000 H, 2 000 µF a 2 MΩ pri frekvenciách 100 Hz alebo 1 kHz, s použitím sériových alebo paralelných hodnôt. Na účely merania TER v rámci skúšky žieravosti sa zaznamenávajú hodnoty odporu pri frekvencii 100 Hz a s použitím sériových hodnôt. Pred meraním elektrického odporu sa povrchové napätie kože zníži pridaním dostatočného množstva 70 % etanolu tak, aby sa epiderma zakryla. Po niekoľkých sekundách sa etanol z trubice odstráni a tkanivo sa potom zvlhčí pridaním 3 ml roztoku $MgSO_4$ (154 mM). Elektródy meracieho mostíka sa umiestnia na obe strany kožného terčíka a zmeria sa odpor v kΩ/kožný terčík (obrázok 1). Rozmery elektródy a dĺžka exponovanej elektródy pod krokosvorkami sú uvedené na obrázku 2. Svorka vnútornej elektródy je počas merania odporu položená na vrchu trubice z PTFE, aby sa zabezpečilo, že dĺžka elektródy ponorenej v roztoku $MgSO_4$ sa nemení. Vonkajšia elektróda je umiestnená vo vnútri receptorovej komory tak, aby spočívala na dne komory. Udržiava sa konštantná vzdialenosť medzi pružinovou svorkou a dolnou časťou trubice z PTFE (obrázok 2), pretože táto vzdialenosť má vplyv na nameranú hodnotu odporu. Vzdialenosť medzi vnútornou elektródou a kožným terčíkom by preto mala byť konštantná a minimálna (1 – 2 mm).

23. Ak je hodnota nameraného odporu väčšia ako 20 kΩ, môže to byť spôsobené tým, že na povrchu epidermy kožného terčíka sa nachádzajú zvyšky testovanej chemikálie. Táto vrstva sa môže odstrániť napríklad tak, že sa trubica z PTFE utesní palcom chráneným rukavicou a pretrepáva sa asi 10 sekúnd; odstráni sa roztok $MgSO_4$ a zopakuje sa meranie odporu s novým roztokom $MgSO_4$.

24. Vlastnosti a rozmery testovacej aparatúry a použitý experimentálny postup môžu mať vplyv na namerané hodnoty TER. Prahová hodnota 5 kΩ v prípade žieravín bola stanovená na základe údajov získaných špecifickou aparatúrou a špecifickým postupom, ktoré sú popísané v tejto testovacej metóde. Ak sa zmenia podmienky testovania alebo sa použije iná aparatúra, môžu sa použiť iné prahové a kontrolné hodnoty. Metodiku a prahové hodnoty odporu je preto potrebné kalibrovať testovaním série látok na preukázanie spôsobilosti, ktoré sa zvolia z látok použitých vo validačnej štúdii (8) (9), alebo z chemických tried podobných skúmaným látkam. V tabuľke 1 je uvedený zoznam vhodných látok na preukázanie spôsobilosti.

▼M8

Metódy viazania farbiva

25. Expozícia kože určitým nežieravým materiálom môže mať za následok zníženie odporu pod prahovú hodnotu 5 kΩ, v dôsledku čoho sa umožní prienik iónov cez rohovitú vrstvu (*stratum corneum*) a zníži sa elektrický odpor (9). Napríklad neutrálne organické látky a látky, ktoré majú povrchovo aktívne vlastnosti (vrátane detergentov, emulzifikátorov a ostatných povrchovo aktívnych látok), môžu odstrániť kožné lipidy, čím sa bariéra stane pre ióny priepustnejšia. Preto, ak sú hodnoty TER takýchto chemikálií nižšie ako 5 kΩ, alebo sa pohybujú okolo tejto hodnoty, a kožný terčík nie je viditeľne poškodený, malo by sa vykonať posúdenie prieniku farbiva na kontrolných a ošetrených tkanivách, aby sa zistilo, či sú namerané hodnoty TER výsledkom zvýšenej priepustnosti kože alebo poleptania kože (7) (9). V prípade poleptania kože, keď sa rohovitá vrstva *stratum corneum* poruší, farbivo sulforodamín B pri aplikácii na povrch kože ňou rýchlo preniká a sfarbuje podkladové tkanivo. Toto konkrétne farbivo je stabilné v prostredí širokého rozsahu chemikálií a nemá naň vplyv extrakčný postup opísaný ďalej.

Aplikácia a odstránenie farbiva sulforodamínu B

26. Po posúdení TER sa síran horečnatý odstráni z trubice a koža sa pozorne preskúma, či nie je viditeľne poškodená. Ak sa nepozoruje žiadne väčšie viditeľné poškodenie (napr. perforácia), aplikuje sa 150 µl 10 hm./obj. % zriedenia sulforodamínu B (Acid Red 52; č. C.I. 45100; CAS číslo 3520-42-1) v destilovanej vode na každý kožný terčík počas 2 hodín. Tieto kožné terčíky sa potom asi 10 sekúnd omývajú vodou z vodovodu maximálne izbovej teploty, aby sa odstránilo všetko nadbytočné/neviazané farbivo. Všetky kožné terčíky sa opatrne odoberú z trubice z PTFE a umiestnia sa do nádoby (napr. 20 ml sklenená scintilačná nádoba) obsahujúcej deionizovanú vodu (8 ml). Nádoby sa 5 minút ľahko pretrepávajú, aby sa odstránilo nadbytočné neviazané farbivo. Tento postup oplachovania sa potom zopakuje a kožné terčíky sa následne vyberú a vložia do nádob obsahujúcich 5 ml 30 hm./obj. % nátrium-dodecyl-sulfátu (SDS) v destilovanej vode a cez noc sa inkubujú pri teplote 60 °C.

27. Po inkubácii sa všetky kožné terčíky odstránia a zlikvidujú a zostávajúci roztok sa odstreďuje 8 minút pri teplote 21 °C (pri relatívnej odstredivej sile ~ 175 × g). Vzorka supernatantu s objemom 1 ml sa zriedi v pomere 1:5 obj. % [t. j. 1 ml + 4 ml] s 30 hm./obj. % SDS v destilovanej vode. Optická hustota (OD) roztoku sa meria pri 565 nm.

Výpočet obsahu farbiva

28. Obsah farbiva sulforodamín B v kožnom terčíku sa vypočíta z hodnôt OD (9) (molárny koeficient extinkcie farbiva sulforodamín B pri 565 nm = $8{,}7 \times l0^4$, molekulová hmotnosť = 580). Obsah farbiva sa určí pre každý kožný terčík s využitím vhodnej kalibračnej krivky a potom sa vypočíta stredná hodnota obsahu farbiva pre replikáty.

Kritériá prijateľnosti

29. Stredné hodnoty výsledkov TER sú prijateľné, ak súbežne namerané hodnoty pozitívnej aj negatívnej kontroly spadajú do prijateľných rozsahov danej metódy v danom skúšobnom laboratóriu. Pre opísanú metodiku a aparatúru sú prijateľné hodnoty rozsahov odporu uvedené v tejto tabuľke:

▼**M8**

Kontrola	Látka	Rozsah odporu (kΩ)
pozitívna	10 M kyselina chlorovodíková	0,5 – 1,0
negatívna	destilovaná voda	10 – 25

30. Výsledné stredné hodnoty viazania farbiva sú prijateľné, ak hodnoty pre súbežné kontroly spadajú do prijateľných rozsahov danej metódy. Pre opísanú metodiku a aparatúru sa navrhujú prijateľné rozsahy obsahu farbiva pre kontrolné látky uvedené v tejto tabuľke:

Kontrola	Látka	Rozsah obsahu farbiva (μg/terčík)
pozitívna	10 M kyselina chlorovodíková	40 – 100
negatívna	destilovaná voda	15 – 35

Interpretácia výsledkov

31. Medzná hodnota TER na rozlíšenie medzi žieravou a nežieravou testovanou chemikáliou sa stanovila v rámci optimalizácie testovacej metódy, skúšala sa v predvalidačnej fáze a bola potvrdená formálnou validačnou štúdiou.

32. Prognostický model na testovaciu metódu poleptania kože TER na potkanej koži (9) (19) spojený s klasifikačným systémom GHS OSN/CLP:

Testovaná chemikália sa pokladá za látku nežieravú pre kožu:

i) ak je stredná hodnota TER získaná pre testovanú chemikáliu väčšia ako (>) 5 kΩ, alebo

ii) ak sa stredná hodnota TER získaná pre testovanú chemikáliu rovná 5 kΩ alebo je menšia (≤) a

— nepozoruje sa žiadne viditeľné poškodenie kožných terčíkov (napr. perforácia) a

— stredná hodnota obsahu farbiva kožného terčíka je menšia ako (<) stredná hodnota obsahu farbiva kožného terčíka získaná v rámci súbežne vykonávanej pozitívnej kontroly s 10 M HCl (pre hodnoty pozitívnej kontroly pozri odsek 30).

Testovaná chemikália sa pokladá za žieravú pre kožu:

i) ak sa stredná hodnota TER získaná pre testovanú chemikáliu rovná 5Ω alebo je menšia (≤) a kožné terčíky sú viditeľne poškodené (napr. perforované) alebo

ii) ak sa stredná hodnota TER získaná pre testovanú chemikáliu rovná 5 kΩ alebo je menšia (≤) a

— nepozoruje sa žiadne viditeľné poškodenie kožných terčíkov (napr. perforácia), ale

▼M8

— stredná hodnota obsahu farbiva kožného terčíka sa rovná strednej hodnote obsahu farbiva kožného terčíka získaný v rámci súbežne vykonávanej pozitívnej kontroly s 10 M HCl (pre hodnoty pozitívnej kontroly pozri odsek 30) alebo je väčší (≥).

33. Jeden testovací cyklus (pokus), ktorý sa skladá najmenej z troch replík kožných terčíkov, by mal pre testovanú chemikáliu postačovať, ak je jeho klasifikácia jednoznačná. V prípadoch s hraničnými výsledkami, napríklad ak sa nezhodujú merania replík a/alebo ak sa stredná hodnota TER rovná 5 ±0,5 kΩ, je potrebné zvážiť vykonanie druhého nezávislého testovacieho cyklu (pokusu), ako aj tretieho testovacieho cyklu, ak sa výsledky z prvých dvoch testovacích cyklov (pokusov) nezhodujú.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje

34. Správy o hodnotách odporu (kΩ) a prípadne hodnotách obsahu farbiva (μg/terčík) pre testovanú chemikáliu, ako aj pre pozitívne a negatívne kontroly, by sa mali podávať vo forme tabuliek vrátane údajov pre každý jednotlivý replikát terčíka v každom testovacom cykle (pokuse) a stredné hodnoty ± SD. O všetkých opakovaných pokusoch by sa mali podať správy. Pozorované poškodenie kožných terčíkov by sa malo nahlasovať pre každú testovanú chemikáliu.

Správa o teste

35. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testované chemikálie a kontrolné látky:

— jednozložková látka: identifikácia chemikálie, napr. názov podľa IUPAC alebo CAS, CAS číslo, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak je to vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— mnohozložková látka, UVCB a zmes: charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívny výskyt a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti zložiek,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— zdroj, číslo šarže, ak je k dispozícii,

— prípadná úprava testovanej chemikálie/kontrolnej látky pred testovaním (napr. zahrievanie, drvenie),

— stabilita testovanej chemikálie, konečný dátum použitia alebo dátum opätovnej analýzy, ak sú známe,

— podmienky skladovania.

Pokusné zvieratá:

— kmeň a pohlavie,

— vek zvierat, ak sú použité ako darcovské zvieratá,

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.,

— podrobnosti o príprave kože.

▼**M8**

Podmienky testovania:

— kalibračné krivky testovacej aparatúry,

— kalibračné krivky na vykonanie testu viazania farbiva, pásmový filter použitý na meranie hodnôt optickej hustoty a rozsah linearity optickej hustoty meracieho zariadenia (napr. spektrofotometer), ak je to relevantné,

— podrobnosti o použitom testovacom postupe na meranie TER,

— podrobnosti o testovacom postupe použitom na posúdenie viazania farbiva, ak je to relevantné,

— použité testovacie dávky, trvanie expozičného(-ých) času(-ov) a teplota (-y) expozície,

— podrobnosti o použitých postupoch umývania po expozičnom čase,

— počet replikátov kožných terčíkov použitých pri každej testovanej chemikálii a kontrole (pozitívna aj negatívna kontrola),

— opis každej zmeny testovacieho postupu,

— odkaz na historické údaje o modeli. K nim by mali okrem iného patriť:

i) prijateľnosť hodnôt TER pozitívnej a negatívnej kontroly (v kΩ) s odkazom na rozsahy odporu pozitívnych a negatívnych kontrol;

ii) prijateľnosť hodnôt obsahu farbiva pozitívnej a negatívnej kontroly (v µg/terčík) s odkazom na rozsahy obsahu farbiva pozitívnych a negatívnych kontrol;

iii) prijateľnosť výsledkov testu s odkazom na historickú variabilitu medzi replikátmi kožných terčíkov;

— opis uplatnených rozhodovacích kritérií/prognostických modelov.

Výsledky:

— uvedenie (v podobe tabuliek) údajov zo skúšok TER a skúšok viazania farbiva (v prípade potreby) pre jednotlivé testované chemikálie a kontroly, každý testovací cyklus (pokus) a každý replikát kožného terčíka (jednotlivé zvieratá a jednotlivé vzorky kože), stredné hodnoty, štandardné odchýlky (SD) a variačné koeficienty (CV),

— opis všetkých pozorovaných účinkov,

— odvodená klasifikácia v súvislosti s prognostickým modelom/rozhodovacími kritériami, ktoré sa používajú.

Rozbor výsledkov

Závery

LITERATÚRA

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. K dispozícii na adrese: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

▼**M8**

(2) Kapitola B.4 tejto prílohy, Akútne podráždenie, poleptanie kože.

(3) Kapitola B.40a tejto prílohy, Model kože *in vitro*.

(4) Kapitola B.65 tejto prílohy, Metóda na testovanie s využitím membránovej bariéry *in vitro*.

(5) Kapitola B.46 tejto prílohy, Podráždenie kože *in vitro*: Test na modeli rekonštruovanej ľudskej pokožky.

(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), Organizácia pre hospodársku spoluprácu a rozvoj, Paríž.

(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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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 apríl 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*. Organizácia pre hospodársku spoluprácu a rozvoj, Paríž.

▼**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., a Gardner J. (1992). *The Skin Corrosivity Test In Vitro: Results of an Interlaboratory Trial*. Toxicol. In Vitro 6, 191-194.

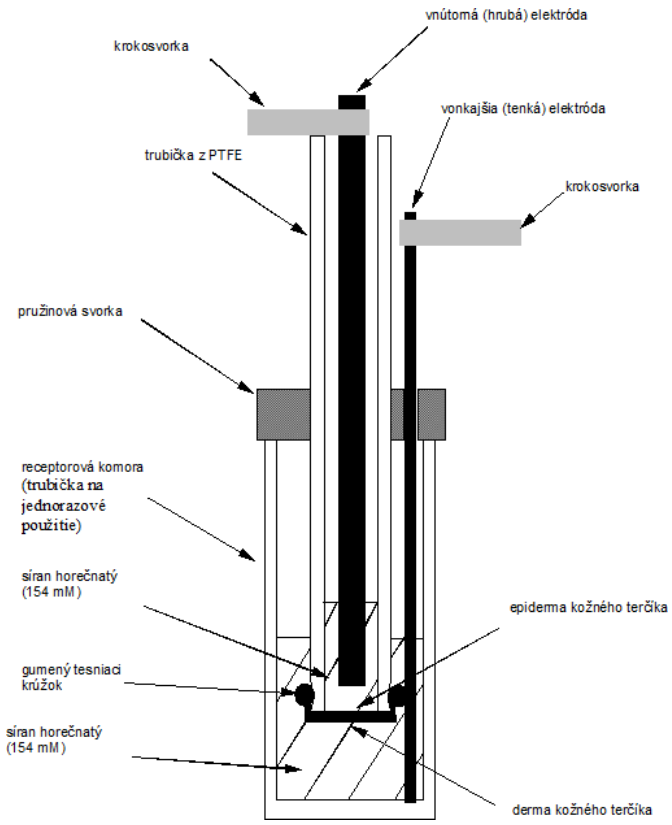
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher 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. a 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), Organizácia pre hospodársku spoluprácu a rozvoj, Paríž.

Obrázok 1

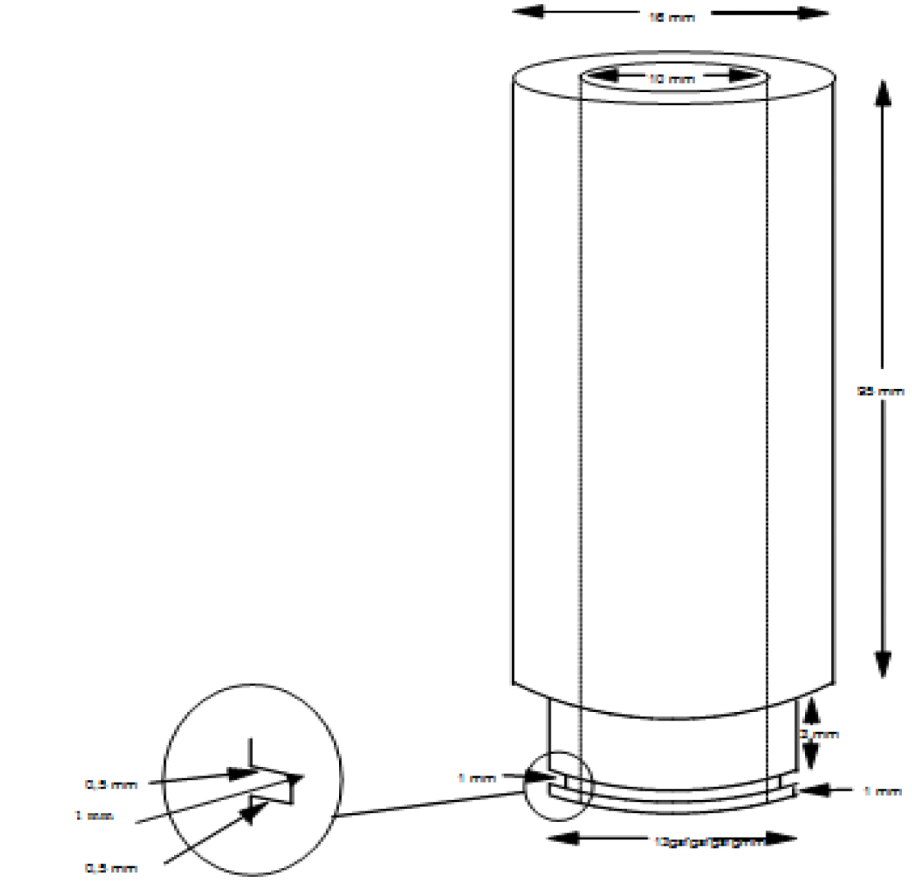
Aparatúra na Meranie ter Potkanej Kože



▼M8

Obrázok 2

Rozmery Polytetrafluóretylénovej Trubice (PTFE) a Trubice Receptora a Použitých Elektród



Rozhodujúce faktory zobrazenej aparatúry:

— vnútorný priemer trubice z PTFE,

— dĺžka elektród v pomere k trubici z PTFE a trubici receptora by mala byť taká, že elektródy nedosahujú ku kožnému terčíku a elektróda so štandardnou dĺžkou je v kontakte s roztokom $MgSO_4$,

▼**M8**

— množstvom roztoku $MgSO_4$ v trubici receptora by sa mala vzhľadom na úroveň hladiny v trubici z PFTE zabezpečiť taká hĺbka tekutiny, ako je znázornené na obrázku 1,

— kožný terčík by mal byť k trubici z PFTE pripevnený tak, aby elektrický odpor predstavoval skutočnú mieru vlastností kože.

▼M8

Dodatok

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: Miera zhody výsledkov testovacej metódy a akceptovaných referenčných hodnôt. Ide o mieru výkonnosti testovacej metódy a jedno z rozhodujúcich hľadísk. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (20).

C: Žieravina.

Chemikália: látka alebo zmes.

Zhoda: miera výkonnosti testovacej metódy v rámci skúšobných metód, ktoré poskytujú jednoznačný výsledok, a tiež jedno z rozhodujúcich hľadísk. Tento pojem sa niekedy používa zameniteľne s pojmom presnosť a vymedzuje sa ako podiel všetkých testovaných chemikálií, ktoré sú správne klasifikované ako pozitívne alebo negatívne. Zhoda je vo vysokej miere závislá od prevalencie pozitívnych výsledkov v typoch testovaných chemikálií, ktoré sa skúmajú (20).

GHS [Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií (OSN)]: systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálnej, zdravotnej a environmentálnej nebezpečnosti a ich označovanie zodpovedajúcimi komunikačnými prvkami, ako sú piktogramy, výstražné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o nepriaznivých účinkoch daných chemikálií v záujme ochrany osôb (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a subjektov reakcie na núdzové situácie) a životného prostredia (1).

IATA: integrovaný prístup k testovaniu a hodnoteniu.

Zmes: zmes alebo roztok, ktoré sú zložené z dvoch alebo viacerých látok.

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej 80 hm. %.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii ≥ 10 hm. % a < 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo ku chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

NC: nežieravá látka.

OD: optická hustota.

PC: pozitívna kontrola, replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému, ošetrený látkou, o ktorej sa vie, že vyvoláva pozitívnu odozvu. Aby sa zabezpečila možnosť hodnotenia variability odozvy pozitívnej kontroly v priebehu času, rozsah pozitívnej odozvy by nemal byť nadmerný.

▼M8

Výkonnostné normy (Performance standards – PS): normy založené na validovanej testovacej metóde, ktoré slúžia ako základ na hodnotenie porovnateľnosti navrhovanej testovacej metódy, ktorá je mechanicky a funkčne podobná. Patria sem: i) nevyhnutné zložky testovacej metódy; ii) minimálny zoznam referenčných chemikálií vybraných spomedzi chemikálií používaných na preukázanie prijateľnej výkonnosti validovanej testovacej metódy; a iii) podobné úrovne presnosti a spoľahlivosti založené na tom, čo sa získalo pri validovanej testovacej metóde a čo by navrhovaná testovacia metóda mala preukázať pri hodnotení pomocou minimálneho zoznamu referenčných chemikálií.

Relevantnosť: opis vzťahu testovacej metódy k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej testovacia metóda správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testovacej metódy (20).

Spoľahlivosť: vyjadruje rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda v priebehu času reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, ak sa pri nej používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti (20).

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií správne klasifikovaných testovacou metódou. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje jednoznačné výsledky, pričom ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (20).

Poleptanie kože *in vivo*: vznik nevratného poškodenia kože; konkrétne ide o viditeľnú nekrózu cez pokožku až do kože po aplikácii testovanej chemikálie, a to až do štyroch hodín. Pre reakcie v dôsledku poleptania sú typické vredy, krvácanie, krvavé chrasty a na konci pozorovania po 14 dňoch zmena farby v dôsledku vyblednutia kože, celé plochy postihnuté alopéciou a jazvy. Na vyhodnotenie problematických lézií by sa malo uvažovať o histopatológii.

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií správne klasifikovaných testovacou metódou. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje jednoznačné výsledky, a ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (20).

Látka: chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie stability látky a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ale s vylúčením všetkých rozpúšťadiel, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo bez zmeny jej zloženia.

(Testovací) cyklus: jedna testovaná chemikália, ktorá sa testuje súbežne minimálne v troch paralelných kožných terčíkoch.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje touto testovacou metódou.

Transkutánny elektrický odpor (TER): je miera elektrickej impedancie kože vyjadrená ako hodnota odporu v kiloohmoch. Jednoduchá a spoľahlivá metóda posúdenia bariérovej funkcie spočíva v zaznamenávaní prechodu iónov cez kožu s použitím aparatúry s Wheatstonovým mostíkom.

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

▼M8

B.40a. **POLEPTANIE KOŽE *IN VITRO*: TESTOVACIA METÓDA S POUŽITÍM REKONŠTRUOVANEJ ĽUDSKEJ POKOŽKY (RhE)**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda (TM) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 431 (2016). Poleptanie kože je vznik nevratného poškodenia kože, ktoré sa prejavuje ako viditeľná nekróza cez epidermu až do dermy po aplikácii testovanej chemikálie [v znení definície podľa Globálneho harmonizovaného systému klasifikácie a označovania chemických látok (GHS) Organizácie Spojených národov (OSN) (1) a nariadenia Európskej únie (EÚ) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (CLP) ([1])]. Touto aktualizovanou testovacou metódou B.40a sa zabezpečuje postup *in vitro*, ktorý umožňuje identifikáciu nežieravých a žieravých látok a zmesí v súlade s GHS OSN a CLP. Umožňuje sa ňou aj čiastočné zaradenie žieravých látok do podkategórií.

2. Posudzovanie žieravých vlastností chemikálií pre kožu sa zvyčajne vykonávalo na laboratórnych zvieratách (TM B.4, rovnocenná s usmernením OECD TG 404, ktoré bolo pôvodne prijaté v roku 1981 a revidované v rokoch 1992, 2002 a 2015) (2). Okrem súčasnej testovacej metódy B.40a sa validovali a prijali dve ďalšie testovacie metódy *in vitro* na testovanie žieravých vlastností chemikálií – TM B.40 (rovnocenná s usmernením OECD TG 430) (3) a TM B.65 (rovnocenná s usmernením OECD TG 435) (4). Okrem toho sa na testovanie vlastností dráždivosti pre kožu prijala metóda*in vitro* TM B.46 (rovnocenná s usmernením OECD TG 439) (5). V usmerňovacom dokumente OECD o integrovaných prístupoch k testovaniu a hodnoteniu (IATA) v prípade poleptania a podráždenia kože sa opisuje viacero modulov, v ktorých sú zoskupené zdroje informácií a analytické nástroje, pričom sa v ňom uvádza usmernenie o tom, i) ako integrovať a používať existujúce údaje z testovania, ako aj údaje nepochádzajúce z testovania na posúdenie dráždivých a žieravých vlastností chemikálií pre kožu a ii) navrhuje sa prístup v prípade potreby ďalšieho testovania (6).

3. Táto testovacia metóda sa týka podráždenia kože ako sledovaného parametra ľudského zdravia. Využíva sa pri nej rekonštruovaná ľudská pokožka (RhE) (získaná z netransformovaných keratinocytov získaných z ľudskej pokožky), ktorá dôkladne napodobňuje histologické, morfologické, biochemické a fyziologické vlastnosti vrchných častí ľudskej kože, t. j. pokožky. Príslušné usmernenie OECD na vykonávanie testov sa pôvodne prijalo v roku 2004, pričom v roku 2013 sa aktualizovalo s cieľom začleniť doň dodatočné testovacie metódy, pri ktorých sa používa model RhE, ako aj možnosť používať metódy umožňujúce zaradenie žieravých chemikálií do podkategórií, a v roku 2015 sa aktualizovalo s cieľom odkázať na usmerňovací dokument IATA a zaviesť používanie alternatívneho postupu na meranie životaschopnosti.

4. V tejto testovacej metóde sú začlenené štyri validované komerčne dostupné modely RhE. V prípade dvoch z týchto komerčne dostupných modelov testovania – EpiSkin™ Standard Model (SM) a EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (na ktoré sa ďalej v texte odkazuje ako na validované referenčné metódy alebo VRM) sa vykonali predvalidačné štúdie (7), po ktorých nasledovala riadna validačná štúdia na posúdenie poleptania kože (8)(9)(10)(11) (12). Výsledky týchto štúdií viedli k odporúčaniu, že dve uvedené validované referenčné metódy by sa mohli používať na regulačné účely na odlíšenie žieravých (C) a nežieravých (NC) látok a že model

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006 (Ú. v. EÚ L 353/1, 31.12.2008).

▼M8

EpiSkin™ by sa navyše mohol používať na podporu zaradenia žieravých látok do podkategórií (13)(14)(15). Dvoma ďalšími komerčne dostupnými modelmi RhE testovania poleptania kože *in vitro* sa dospelo k podobným výsledkom ako v prípade EpiDerm™ VRM podľa validácie na základe výkonnostných noriem (16)(17)(18). Ide o modely SkinEthic™ RHE ([1]) a epiCS® (predtým nazvaný EST-1000), ktoré sa takisto môžu používať na regulačné účely na odlíšenie žieravých a nežieravých látok (19)(20). Postvalidačnými štúdiami, ktoré vykonali výrobcovia modelu RhE v rokoch 2012 až 2014 s prepracovaným protokolom s korekciou na interferencie nešpecifickej redukcie MTT prostredníctvom testovaných chemikálií, sa zlepšila výkonnosť odlišovania žieravých a nežieravých látok, ako aj podpora zaraďovania žieravých látok do podkategórií (21)(22). Ďalšie štatistické analýzy postvalidačných údajov, ktoré boli získané pomocou EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE a EpiCS® sa vykonali s cieľom identifikovať alternatívne prediktívne modely, ktorými sa zlepšila prediktívna schopnosť na účely podkategorizácie (23).

5. Pred tým, ako sa môže na regulačné účely použiť navrhovaná podobná alebo upravená metóda RhE *in vitro* na testovanie poleptania kože, ktorá je iná ako validované referenčné metódy, by sa mala stanoviť jej spoľahlivosť, relevantnosť (presnosť) a obmedzenia jej navrhovaného používania, aby sa zabezpečila podobnosť s validovanými referenčnými metódami v súlade s požiadavkami výkonnostných noriem (PS) (24) stanovenými v súlade so zásadami usmerňovacieho dokumentu OECD č. 34 (25). Vzájomné uznávanie údajov je možné zaručiť len po tom, ako sa každá navrhovaná nová alebo aktualizovaná testovacia metóda na základe výkonnostných noriem preskúma a zaradí do príslušného usmernenia na vykonávanie testov. Modely testovania zaradené do uvedeného usmernenia na vykonávanie testov možno využívať na riešenie požiadaviek krajín, ktoré sa týkajú výsledkov testov v súvislosti s metódou testovania poleptania kože *in vitro*, a to pri súčasnom využívaní prínosov plynúcich zo vzájomného uznávania údajov.

VYMEDZENIE POJMOV

6. Vymedzenie použitých pojmov sa uvádza v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY

7. Touto testovacou metódou sa umožňuje identifikácia nežieravých a žieravých látok a zmesí v súlade s GHS OSN a CLP. Touto testovacou metódou sa okrem toho podporuje podkategorizácia žieravých látok a zmesí do nepovinnej podkategórie 1A v súlade s GHS OSN (1), ako aj kombinácia podkategórií 1B a 1C (21)(22)(23). Obmedzením tejto metódy je skutočnosť, že neumožňuje rozlišovanie medzi podkategóriami poleptania kože 1B a 1C v súlade s GHS OSN a CLP v dôsledku obmedzeného súboru známych žieravých chemikálií *in vivo* podkategórie 1C. Na základe modelov testovania EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE a epiCS® je možné zaraďovanie do podkategórií (t. j. 1A verzus 1B a 1C verzus NC).

8. Pri validácii podporujúcej modely testovania zahrnuté do tejto testovacej metódy, ak sa používajú na identifikáciu nežieravých a žieravých látok, sa testovala široká škála chemikálií predstavujúcich predovšetkým individuálne látky. empirická databáza validačnej štúdie obsahovala celkovo 60 chemikálií, ktoré sa vzťahujú na širokú škálu tried chemikálií (8)(9)(10). Autori testovacej metódy vykonali testovanie na preukázanie citlivosti, špecifickosti, presnosti

([1]) Skratka RhE (rekonštruovaná ľudská pokožka) sa používa pre všetky modely založené na technológii RhE. Skratka RHE používaná v spojitosti s modelom SkinEthic™ znamená to isté, ale ako súčasť názvu tejto špecifickej testovacej metódy v podobe uvádzanej na trh sa píše celá veľkými písmenami.

▼M8

a vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti skúšky na účely podkategorizácie a výsledky preskúmala organizácia OECD (21) (22) (23). Na základe celkových dostupných údajov je daná testovacia metóda uplatniteľná na širokú škálu tried chemikálií a fyzikálnych stavov vrátane kvapalín, polotuhých látok, tuhých látok a voskov. Kvapaliny môžu byť vodné alebo nevodné; tuhé látky môžu byť rozpustné alebo nerozpustné vo vode. Tuhé materiály by sa mali podľa možnosti pred aplikáciou zomlieť na jemný prášok; žiadne iné predchádzajúce ošetrenie vzorky sa nevyžaduje. V prípadoch, keď je možné preukázať dôkazy o nepoužiteľnosti testovacích modelov zahrnutých do tejto testovacej metódy v prípade iných špecifických kategórií testovaných chemikálií, by sa tieto modely nemali použiť pri uvedenej špecifickej kategórii testovaných chemikálií. Táto testovacia metóda sa okrem toho považuje za použiteľnú v prípade zmesí ako rozšírenie jej použiteľnosti pri látkach. Vzhľadom na skutočnosť, že zmesi zahŕňajú široké spektrum kategórií a zloženia, a na skutočnosť, že v súčasnosti sú dostupné iba obmedzené informácie o testovaní zmesí, v prípadoch, keď možno preukázať dôkazy o nepoužiteľnosti testovacej metódy pri špecifickej kategórii zmesí (napr. na základe stratégie navrhovanej v odseku 26), by sa však daná testovacia metóda nemala používať pri uvedenej špecifickej kategórii zmesí. Pred použitím danej testovacej metódy na zmesi s cieľom generovať údaje plánované na regulačné účely by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na daný účel, a ak áno, prečo. Takéto úvahy nie sú potrebné, ak existuje regulačná požiadavka na testovanie danej zmesi. Plyny a aerosóly ešte neboli posúdené vo validačných štúdiách (8)(9)(10). Aj keď je možné, že tieto látky sa môžu testovať použitím technológie RhE, aktuálna testovacia metóda neumožňuje testovanie plynov a aerosólov.

9. Testované chemikálie absorbujúce svetlo v rovnakom rozsahu ako formazán MTT a testované chemikálie so schopnosťou priamo redukovať vitálne farbivo MTT (na formazán MTT) môžu interferovať s výsledkami merania životaschopnosti tkaniva a môžu si vyžadovať použitie upravených kontrol na korekcie. Typ prispôsobených kontrol, ktoré môžu byť potrebné, sa bude rôzniť v závislosti od typu interferencie produkovanej testovanou chemikáliou a postupu použitého na meranie formazánu MTT (pozri odseky 25–31).

10. Keďže táto testovacia metóda neposkytuje dostatočné informácie o podráždení kože, treba poznamenať, že TM B.46 sa špecificky zameriava na zdravotný účinok podráždenia kože *in vitro* a je založená na tom istom systéme testovania na modeli RhE, hoci sa pri nej používa iný protokol (5). Na úplné vyhodnotenie lokálnych účinkov na kožu po jednorazovej expozícii kože by sa mal použiť usmerňovací dokument OECD o integrovaných prístupoch k testovaniu a hodnoteniu (6). Tento prístup IATA zahŕňa vykonanie *in vitro* testov poleptania kože (opísaných v tejto testovacej metóde) a podráždenia kože pred zvážením testovania na živých zvieratách. Je známe, že použitie ľudskej kože podlieha vnútroštátnym a medzinárodným etickým zásadám a podmienkam.

PRINCÍP TESTU

11. Testovaná chemikália sa lokálne aplikuje na trojrozmerný model RhE pozostávajúci z netransformovaných keratinocytov získaných z ľudskej pokožky, ktoré sa vykultivovali tak, aby vytvorili viacvrstvový, vysoko diferencovaný model ľudskej pokožky. Pozostáva z organizovanej bazálnej vrstvy, vrstvy ostnitých buniek a vrstvy zrnitých buniek a viacvrstvovej rohovitej vrstvy (*stratum corneum*) obsahujúcej medzibunkové lipidové lamelové vrstvy predstavujúce hlavné triedy lipidov, ktoré sú analogické s vrstvami nachádzajúcimi sa *in vivo.*

▼M8

12. Testovacia metóda RhE sa zakladá na predpoklade, že žieravé chemikálie sú schopné preniknúť rohovitou vrstvou (*stratum corneum*) difúziou alebo eróziou a sú cytotoxické pre bunky v hlbších vrstvách. Životaschopnosť buniek sa meria enzymatickou premenou vitálneho farbiva MTT [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium-bromid, tiazolylová modrá; CAS číslo 298-93-1] na modrú formazánovú soľ, ktorá sa kvantitatívne meria po extrakcii z tkanív (27). Žieravé chemikálie sa identifikujú na základe ich schopnosti spôsobiť pokles životaschopnosti buniek pod vymedzené prahové úrovne (pozri odseky 35 a 36). Ukázalo sa, že testovacia metóda poleptania kože s použitím RhE umožňuje predvídať výsledky zisťovania poleptania kože *in vivo* pri králikoch podľa TM B.4 (2).

PREUKAZOVANIE SPÔSOBILOSTI

13. Pred bežným použitím ktoréhokoľvek zo štyroch validovaných testovacích modelov RhE, ktoré zodpovedajú požiadavkám tejto testovacej metódy, by mali laboratóriá preukázať technickú spôsobilosť správnou klasifikáciou dvanástich chemikálií na preukázanie spôsobilosti uvedených v tabuľke 1. V prípade použitia metódy podklasifikácie by sa zároveň mala preukázať správnosť daného zaradenia do podkategórie. V prípadoch, keď uvedená látka nie je k dispozícii alebo keď je to odôvodniteľné, možno použiť inú látku, pri ktorej sú k dispozícii primerané referenčné údaje *in vivo* a *in vitro* [napríklad zo zoznamu referenčných chemikálií (24)], za predpokladu, že sa uplatnia rovnaké kritériá výberu, ktoré sú opísané v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Zoznam chemikálií na preukázanie spôsobilosti (1)

Látka	CAS č.	Chemická trieda (2)	Kat. GHS OSN/CLP založená na výsledkoch *In Vivo* (testov) (3)	VRM kat. založená na výsledkoch *In Vitro* (4)	MTT redukcia (5)	Fyzikálny stav
Žieraviny *in vivo*, podkategória 1A						
kyselina brómoctová	79-08-3	organická kyselina	1A	(3) 1A	—	tuhá látka
dihydrát fluoridu boritého	13319-75-0	anorganická kyselina	1A	(3) 1A	—	kvapalina
fenol	108-95-2	fenol	1A	(3) 1A	—	tuhá látka
dichlóracetyl chlorid	79-36-7	elektrofil	1A	(3) 1A	—	kvapalina
Žieraviny *in vivo*, kombinácia podkategórií 1B a 1C						
monohydrát kyseliny glyoxylovej	563-96-2	organická kyselina	1B a 1C	(3) 1B a 1C	—	tuhá látka
kyselina mliečna	598-82-3	organická kyselina	1B a 1C	(3) 1B a 1C	—	kvapalina
etanolamín	141-43-5	organická báza	1B	(3) 1B a 1C	áno	viskózna látka

▼**M8**

Látka	CAS č.	Chemická trieda ([2])	Kat. GHS OSN/CLP založená na výsledkoch *In Vivo* (testov) ([3])	VRM kat. založená na výsledkoch *In Vitro* ([4])	MTT redukcia ([5])	Fyzikálny stav
Žieraviny *in vivo*, podkategória 1A						
kyselina chlorovodíková (14,4 %)	7647-01-0	anorganická kyselina	1B a 1C	(3) 1B a 1C	—	kvapalina
Nežieravé látky *In Vivo*						
fenetylbromid	103-63-9	elektrofil	nežier(NC)-	(3) nežier(NC)-	áno	kvapalina
4H-1,2,4-triazolylamín	584-13-4	organická báza	nežier(NC)-	(3) nežier(NC)-	—	tuhá látka
4-(metylsulfanyl) benzaldehyd	3446-89-7	elektrofil	nežier(NC)-	(3) nežier(NC)-	áno	kvapalina
kyselina laurová	143-07-7	organická kyselina	nežier(NC)-	(3) nežier(NC)-	—	tuhá látka

Skratky: CASRN = registračné číslo CAS (CAS číslo, Chemical Abstracts Service Registry Number) VRM = validovaná referenčná metóda; NC = nežieravá chemikália.

([1]) Látky na preukázanie spôsobilosti, rozdelené najprv podľa toho, či ide o žieravé alebo nežieravé látky, potom podľa podkategórie žieravých látok a následne podľa chemickej triedy, boli vybraté spomedzi látok použitých vo validačných štúdiách centra ECVAM týkajúcich sa modelov EpiSkin™ a EpiDerm™ (8) (9) (10) a z postvalidačných štúdií na základe údajov poskytnutých autormi EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ a epiCS® (23). Pokiaľ to nebolo uvedené inak, látky boli testované na úrovni čistoty získanej pri nákupe z komerčného zdroja (8) (10). Výber v najvyššej možnej miere zahŕňa látky, ktoré: i) sú reprezentatívne z hľadiska rozsahu poleptania (napr. nežieravé látky; slabé až silné žieraviny), ktoré možno zmerať alebo predpovedať prostredníctvom validovaných referenčných metód; ii) sú reprezentatívne z hľadiska chemických tried použitých vo validačných štúdiách; iii) majú dobre definované chemické štruktúry; iv) pri validovanej referenčnej metóde vyvolávajú reprodukovateľné výsledky; v) pri referenčnej testovacej metóde *in vivo* vyvolávajú konečné výsledky; vi) sú komerčne dostupné a vii) nesúvisia s neúmernými nákladmi na zneškodnenie.

([2]) Chemická trieda pridelená prostredníctvom Barratt *et al.* (8).

([3]) Zodpovedajúce skupiny obalov OSN sú I, II a III (v danom poradí), pre GHS OSN/CLP 1A, 1B a 1C.

([4]) Predpoklady validovanej referenčnej metódy *in vitro* uvedené v tejto tabuľke boli získané prostredníctvom testovacích modelov EpiSkin™ a EpiDerm™ počas postvalidačného testovania, ktoré vykonali autori testovacej metódy.

([5]) Hodnoty životaschopnosti získané pri validačných štúdiách centra ECVAM zameraných na poleptanie kože neboli upravené vzhľadom na priamu redukciu MTT (usmrtené kontroly sa vo validačných štúdiách nevykonávali). Postvalidačné údaje generované autormi testovacej metódy, ktoré sú uvedené v tejto tabuľke (23), sa však získali na základe prispôsobených kontrol.

14. Ako súčasť postupu overovania spôsobilosti sa odporúča, aby používateľ overil bariérové vlastnosti tkanív po ich prijatí, ako to stanovuje výrobca modelu RhE. To je osobitne dôležité najmä vtedy, ak sa tkanivá zasielajú na veľkú vzdialenosť alebo počas dlhých časových období. Po úspešnom stanovení testovacej metódy a preukázaní spôsobilosti na jej použitie už takéto overovanie nebude bežne potrebné. Pri bežnom používaní testovacej metódy sa však odporúča naďalej v pravidelných intervaloch posudzovať bariérové vlastnosti.

POSTUP

15. Nasleduje všeobecný opis zložiek a postupov testovacích modelov RhE určených na posúdenie poleptania kože, na ktoré sa táto metóda vzťahuje. Modely RhE schválené ako vedecky platné na použitie v rámci tejto testovacej metódy, *t. j.* modely EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE a epiCS® (16)(17)(19)(28)(29)(30)(31)(32)(33), možno získať z komerčných zdrojov. Pre tieto štyri modely RhE sú k dispozícii štandardné operačné postupy (SOP) (34) (35) (36) (37) a hlavné zložky

▼M8

testovacej metódy sú zhrnuté v dodatku 2. Pri uplatňovaní a používaní jedného z týchto modelov v laboratóriu sa odporúča použitie príslušných štandardných operačných postupov. Testovanie so štyrmi testovacími modelmi RhE, na ktoré sa vzťahuje táto testovacia metóda, by malo byť v súlade s týmto:

ZLOŽKY TESTOVACEJ METÓDY S POUŽITÍM RHE

Všeobecné podmienky

16. Na rekonštrukciu epitelu by sa mali použiť netransformované ľudské keratinocyty. Pod funkčnou vrstvou *stratum corneum* by sa malo nachádzať viacero vrstiev životaschopných epitelových buniek (bazálna vrstva, *stratum spinosum, stratum granulosum*). Rohovitá vrstva *stratum corneum* by mala byť viacvrstvová a obsahovať základný lipidový profil, aby sa vytvorila silná funkčná bariéra, ktorá odolá rýchlemu prenikaniu cytotoxických referenčných chemikálií, ku ktorým patrí napríklad dodecylsulfát sodný (SDS) alebo Triton X-100. Mala by sa preukázať bariérová funkcia, ktorá sa môže posudzovať buď stanovením koncentrácie, pri ktorej referenčná chemikália znižuje životaschopnosť tkanív o 50 % (IC_{50}) po pevne stanovenom expozičnom čase, alebo stanovením expozičného času, ktorý je potrebný na zníženie životaschopnosti buniek o 50 % (ET_{50}) po aplikácii referenčnej chemikálie v určenej pevne stanovenej koncentrácii (pozri odsek 18). Izolačné vlastnosti modelu RhE by mali zabrániť prieniku materiálu okolo *stratum corneum* do životaschopného tkaniva, čo by viedlo k chybnému modelovaniu expozície kože. Model RhE by nemal byť kontaminovaný baktériami, vírusmi, mykoplazmami ani hubami.

Funkčné podmienky

Životaschopnosť

17. Skúška použitá na kvantifikovanie životaschopnosti tkaniva je skúška MTT (27). Životaschopné bunky RhE modelu tkaniva redukujú vitálne farbivo MTT na vyzrážaný modrý formazánový produkt MTT, ktorý sa potom z tkaniva extrahuje pomocou izopropanolu (alebo podobného rozpúšťadla). Optická hustota (OD) samotného extrakčného rozpúšťadla by mala byť dostatočne nízka, t. j. OD < 0,1. Extrahovaný formazán MTT môže byť kvantifikovaný buď meraním absorbancie štandardu (OD) alebo spektrofotometriou HPLC/UPLC (38). Používatelia modelu RhE by sa mali ubezpečiť, že každá šarža použitého modelu RhE spĺňa kritériá stanovené pre negatívnu kontrolu. Rozsah prijateľnosti (hornú a dolnú hranicu) pre hodnoty optickej hustoty negatívnej kontroly by mal stanoviť autor/dodávateľ modelu RhE. V tabuľke 2 sú uvedené rozsahy prijateľnosti pre hodnoty optickej hustoty pri negatívnej kontrole v prípade štyroch validovaných testovacích modelov RhE zahrnutých v tejto testovacej metóde. Používateľ spektrofotometrie HPLC/UPLC by mal pri negatívnej kontrole ako akceptačné kritérium použiť rozsahy optickej hustoty pri negatívnej kontrole stanovené v tabuľke 2. Malo by sa zaznamenať, že tkanivá ošetrené negatívnou kontrolou sú počas času expozície stabilné v kultúre (zabezpečujú podobné výsledky merania optickej hustoty).

Tabuľka 2

Rozsahy prijateľnosti hodnôt optickej hustoty pri negatívnej kontrole na kontrolu kvality šarže

	Dolná hranica prijateľnosti	Horná hranica prijateľnosti
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

▼**M8**

Bariérová funkcia

18. Rohovitá vrstva *stratum corneum* a jej lipidové zloženie by mali byť dostačujúce na zabránenie rýchlemu prieniku určitých cytotoxických referenčných chemikálií (napr. SDS alebo Triton X-100), a to podľa odhadu pomocou IC_{50} alebo ET_{50} (tabuľka 3). Autor/predajca modelu RhE by mal pri dodaní tkanív konečnému používateľovi predviesť bariérovú funkciu každej šarže použitého modelu RhE (pozri odsek 21).

Morfológia

19. Model RhE by sa mal histologicky preskúmať, pričom by sa mala preukázať viacvrstvová štruktúra podobná ľudskej pokožke, ktorá obsahuje *stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum* a *stratum corneum* a ktorá vykazuje lipidový profil podobný lipidovému profilu ľudskej pokožky. Autor/predajca modelu RhE by mal pri dodaní tkanív konečnému používateľovi zabezpečiť histologické preskúmanie každej šarže použitého modelu RhE, pričom by sa mala preukázať vhodná morfológia tkanív (pozri odsek 21).

Reprodukovateľnosť

20. Používatelia testovacej metódy by mali preukázať reprodukovateľnosť testovacích metód v priebehu času s pozitívnymi a negatívnymi kontrolami. Daná testovacia metóda by sa navyše mala používať len v prípade, ak autor/dodávateľ modelu RhE poskytne údaje preukazujúce reprodukovateľnosť v priebehu času so žieravými a nežieravými chemikáliami, napríklad chemikáliami zo zoznamu chemikálií na preukázanie spôsobilosti (tabuľka 1). V prípade použitia testovacej metódy na účely zaraďovania do podkategórií by sa mala preukázať aj reprodukovateľnosť s ohľadom na zaraďovanie do podkategórií.

Kontrola kvality (QC)

21. Model RhE by sa mal používať len v prípade, ak autor/dodávateľ preukáže, že každá šarža použitého modelu RhE spĺňa stanovené kritériá na uvoľnenie do obehu, v rámci ktorých sú najvýznamnejšie kritériá *životaschopnosti* (odsek 17), *bariérovej funkcie* (odsek 18) a *morfológie* (odsek 19). Tieto údaje sa poskytujú používateľom testovacej metódy, aby mohli túto informáciu zahrnúť do správy o teste. V záujme spoľahlivej prognózy klasifikácie žieravín sú akceptovateľné len výsledky, ktoré sa získali zo šarží tkaniva prijateľných v rámci kontroly kvality. Rozsah prijateľnosti (hornú a dolnú hranicu) pre IC50 alebo ET50 stanovuje autor/dodávateľ modelu RhE. Rozsahy prijateľnosti pre dané štyri validované testovacie modely sú uvedené v tabuľke 3.

Tabuľka 3

Kritériá kontroly kvality na uvoľnenie šarží do obehu

	Dolná hranica prijateľnosti	Horná hranica prijateľnosti
EpiSkin™ (SM) (18-hodinové ošetrenie SDS) (33)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34)	ET50 = 4,0 hodiny	ET50 = 8,7 hodiny
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET50 = 4,0 hodiny	ET50 = 10,0 hodiny
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET50 = 2,0 hodiny	ET50 = 7,0 hodiny

▼M8

Aplikácia testovaných chemikálií a kontrolných chemikálií

22. Pri každej testovanej chemikálii a kontrolách by sa mali použiť aspoň dve replikáty tkaniva na každý expozičný čas. V prípade kvapalných aj tuhých chemikálií je potrebné na povrch pokožky rovnomerne naniesť dostatočné množstvo testovanej chemikálie, pričom je nutné vyhýbať sa nekonečnej dávke, t. j. malo by sa použiť minimálne 70 µL/cm^2 alebo 30 mg/cm^2. V závislosti od modelov by sa mal pred aplikáciou tuhých chemikálií povrch pokožky zvlhčiť deionizovanou alebo destilovanou vodou, aby sa tak zlepšil kontakt testovanej chemikálie s povrchom pokožky (34)(35)(36)(37). Tuhé látky by sa mali podľa možnosti testovať vo forme jemného prášku. Metóda aplikácie by mala byť vhodná pre testovanú chemikáliu (pozri napr. odkazy 34 – 37). Na konci expozičného obdobia by sa testovaná chemikália mala z pokožky dôkladne zmyť tlmivým roztokom alebo 0,9 % roztokom NaCl. V závislosti od toho, ktorý zo štyroch validovaných testovacích modelov RhE sa použije, sa pri každej testovanej chemikálii použijú dva alebo tri expozičné časy (v prípade všetkých štyroch validovaných modelov RhE: 3 minúty a 1 hodina; v prípade EpiSkin™ dodatočný expozičný čas v trvaní 4 hodín). V závislosti od použitého testovacieho modelu RhE a posudzovaného expozičného času sa môže inkubačná teplota počas expozície pohybovať v rozmedzí izbovej teploty a 37 °C.

23. V každom testovacom cykle by sa mali súbežne použiť negatívne a pozitívne kontroly (PC), aby sa preukázalo, že životaschopnosť (s negatívnymi kontrolami), bariérová funkcia a výsledná tkanivová citlivosť (s pozitívnou kontrolou) tkanív sa nachádzajú v rámci stanoveného historického rozsahu prijateľnosti. Navrhovanými chemikáliami na pozitívnu kontrolu sú ľadová kyselina octová alebo 8N KOH, a to v závislosti od použitého modelu RhE. Je potrebné poznamenať, že 8N KOH je priamym reduktantom MTT a môže si vyžadovať prispôsobené kontroly podľa opisu v odsekoch 25 a 26. Odporúčanými látkami pre negatívnu kontrolu sú 0,9 % roztok NaCl (vyjadrené v hm./obj. %) alebo voda.

Merania bunkovej životaschopnosti

24. V rámci tejto testovacej metódy by sa na meranie životaschopnosti buniek mala používať skúška MTT, ktorá je kvantitatívnou skúškou (27). Vzorka tkaniva sa na 3 hodiny vloží do roztoku MTT s vhodnou koncentráciou (0,3 alebo 1 mg/ml). Pomocou rozpúšťadla (napr. izopropanol, kyslý izopropanol) sa potom z tkaniva extrahuje vyzrážaný modrý formazánový produkt, pričom koncentrácia formazánu sa odmeria stanovením optickej hustoty pri 570 nm pomocou filtra pásma priepustnosti pásmového filtra maximálne ±30 nm alebo prostredníctvom postupu spektrofotometrie HPLC/UPLC (pozri odseky 30 a 31) (38).

25. Testované chemikálie môžu interferovať so skúškou MTT, a to buď priamou redukciou MTT na modrý formazán, a/alebo prostredníctvom farebnej interferencie, ak testovaná chemikália prirodzene alebo v dôsledku postupov ošetrenia absorbuje v rovnakom rozsahu optickej hustoty (OD) ako formazán (570 ±30 nm, najmä modré a purpurové chemikálie). Na zistenie a korekciu potenciálnej interferencie vyplývajúcej z týchto testovaných chemikálií by sa mali použiť dodatočné kontroly, ako je kontrola nešpecifickej redukcie MTT (NSMTT) a kontrola nešpecifickej farby (NSC) (pozri odseky 26 až 30). To je obzvlášť dôležité vtedy, keď sa špecifická testovaná chemikália úplne neodstráni z tkaniva oplachovaním alebo keď prenikne cez pokožku, a preto je prítomná v tkanivách pri vykonávaní testu životaschopnosti MTT. Podrobný opis úpravy priamej redukcie MTT a interferencií farebnými činidlami sa nachádza v štandardných pracovných postupoch (SOP) pre testovacie modely (34)(35)(36)(37).

▼M8

26. Na určenie priamych reduktantov MTT by sa mala každá testovaná chemikália pridať do čerstvo pripraveného média MTT (34) (35) (36) (37). Ak sa zmes MTT obsahujúca testovanú chemikáliu sfarbí do modra/purpurova, predpokladá sa, že daná testovaná chemikália priamo redukuje MTT, a mala by sa vykonať ďalšia funkčná kontrola neživotaschopnej pokožky, a to nezávisle od použitia merania absorbancie štandardu (OD) alebo spektrofotometrie HPLC/UPLC. Pri tejto dodatočnej funkčnej kontrole sa využívajú usmrtené tkanivá, ktoré majú len zvyškovú metabolickú aktivitu, ale absorbujú testovanú chemikáliu v podobnom množstve ako životaschopné tkanivá. Každá chemikália, ktorá redukuje MTT, sa aplikuje najmenej na dva replikáty usmrteného tkaniva na každý expozičný čas, ktoré sa potom podrobia celému testu poleptania kože. Skutočná životaschopnosť tkaniva sa potom vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaného zo živých tkanív vystavených chemikálii redukujúcej MTT mínus percentuálny podiel nešpecifickej redukcie MTT získaný z usmrtených tkanív vystavených tej istej chemikálii redukujúcej MTT, počítané v porovnaní testovacím cyklom negatívnej kontroly vykonávaným súbežne s upravovaným testom (% NSMTT).

27. Na zistenie interferenčného potenciálu sfarbenými testovanými chemikáliami alebo testovanými chemikáliami, ktoré sa sfarbili pri kontakte s vodou alebo izopropanolom, a aj s cieľom rozhodnúť o potrebe dodatočných kontrol by sa mala vykonať spektrálna analýza testovanej chemikálie vo vode (prostredie počas expozície) a/alebo v izopropanole (extrakčný roztok). Ak testovaná chemikália vo vode a/alebo v izopropanole absorbuje svetlo v rozsahu 570 ±30 nm, mali by sa vykonať ďalšie kontroly s použitím farbiaceho činidla, alebo, ako alternatíva by sa mala použiť spektrofotometria HPLC/UPLC, a v tom prípade sa tieto kontroly nevyžadujú (pozri odseky 30 a 31). Pri meraní absorbancie štandardu (OD) sa každá interferujúca sfarbená testovaná chemikália aplikuje najmenej na dva životaschopné replikáty tkaniva na každý čas expozície, ktoré sa potom podrobia celému testu kožnej leptavosti (žieravosti), ale počas kroku inkubácie sa namiesto roztoku MTT inkubujú s médiom s cieľom vygenerovať kontrolu nešpecifickej farby (NSC_{living}). Kontrola NSC_{living} sa musí vykonávať súbežne na každý čas expozície a na každú sfarbenú testovanú chemikáliu (v každom cykle) z dôvodu inherentnej biologickej variability živých tkanív. Skutočná životaschopnosť tkaniva sa potom vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaného zo živých tkanív, ktoré boli vystavené interferujúcej testovanej chemikálii a inkubované s roztokom MTT mínus percentuálny podiel nešpecifickej farby získanej zo živých tkanív, ktoré boli vystavené interferujúcej testovanej chemikálii a inkubované s médiom bez MTT, čo sa vykonáva súbežne s upravovaným testom (% NSC_{living}).

28. V prípade testovaných chemikálií, ktoré sú identifikované ako chemikálie produkujúce tak priamu redukciu MTT (pozri odsek 26), ako aj farebnú interferenciu (pozri odsek 27), sa bude pri štandardnom meraní absorbancie (OD) vyžadovať aj tretí súbor kontrol, okrem kontrol NSMTT a NSC_{living}, ktoré sú opísané v predchádzajúcich odsekoch. Býva to tak zvyčajne v prípade tmavo sfarbených testovaných chemikálií, ktoré interferujú so skúškou MTT (napr. modré, purpurové, čierne), pretože ich prirodzená farba bráni hodnoteniu ich kapacity priamo redukovať MTT, ako sa opisuje v odseku 26. Tieto testované chemikálie sa môžu viazať tak na živé, ako aj na usmrtené tkanivá, a preto kontrola NSMTT môže nielen korigovať potenciálnu priamu redukciu MTT testovanou chemikáliou, ale aj farebnú interferenciu, ktorá vyplýva z väzby testovanej chemikálie na usmrtené tkanivá. To by mohlo viesť k dvojitej korekcii pri farebnej interferencii, keďže kontrola NSC_{living} už koriguje farebnú interferenciu, ktorá vyplýva z väzby testovanej chemikálie na živé tkanivá. S cieľom vyhnúť sa dvojitej korekcii pri farebnej interferencii je potrebné vykonať tretiu kontrolu pre nešpecifickú farbu v usmrtených tkanivách (NSCkilled). V tejto dodatočnej kontrole sa testovaná chemikália aplikuje najmenej na dva replikáty usmrteného tkaniva na každý expozičný čas, ktoré sa podrobia celému postupu testovania, ale počas kroku inkubácie MTT sa inkubujú s médiom, a nie s roztokom MTT. Na každú testovanú chemikáliu postačuje jediná kontrola NSC_{killed}, a to bez ohľadu na počet vykonaných nezávislých

▼M8

testov/testovacích cyklov, ale mala by sa vykonať súbežne s kontrolou NSMTT a podľa možnosti s tou istou šaržou tkaniva. Skutočná životaschopnosť tkaniva sa potom vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaného zo živých tkanív, ktoré boli vystavené testovanej chemikálii, mínus % NSMTT mínus % NSC_{living} plus percentuálny podiel nešpecifickej farby získanej z usmrtených tkanív, ktoré boli vystavené interferujúcej testovanej chemikálii a inkubované s médiom bez MTT, počítané vo vzťahu k negatívnej kontrole, čo sa vykonáva súbežne s upravovaným testom (% NSC_{killed}).

29. Je dôležité poznamenať, že nešpecifická redukcia MTT a nešpecifické farebné interferencie môžu mať za následok zvýšenie hodnôt tkanivového extraktu nad rozsah linearity spektrofotometra. Na tomto základe by malo každé laboratórium pred začatím testovania testovanej chemikálie na regulačné účely určiť rozsah linearity svojho spektrofotometra s formazánom MTT (CAS č. 57360-69-7) z komerčného zdroja. Meranie absorbancie štandardu (OD) s použitím spektrofotometra je obzvlášť vhodné na posúdenie chemikálií priamo redukujúcich MTT a farebne interferujúcich testovaných chemikálií, keď sa optické hustoty tkanivových extraktov, získaných s testovanou chemikáliou bez akejkoľvek korekcie v prípade priamej redukcie MTT a/alebo farebnej interferencie, nachádzajú v rámci rozsahu linearity spektrofotometra alebo keď nekorigovaný percentný podiel životaschopnosti získaný s testovanou chemikáliou už danú chemikáliu definoval ako žieravú (pozri odseky 35 a 36). K výsledkom v prípade testovaných chemikálií produkujúcich % NSMTT a/alebo % NSC_{liVing} > 50 % negatívnej kontroly by sa však malo pristupovať opatrne.

30. V prípade zafarbených testovaných chemikálií, ktoré nie sú kompatibilné s meraním absorbancie štandardu (OD) z dôvodu príliš silnej interferencie so skúškou MTT, sa môže ako alternatíva na meranie formazánu MTT použiť spektrofotometria HPLC/UPLC (pozri odseky 31 a 37). Systém spektrofotometrie HPLC/UPLC umožňuje oddelenie formazánu MTT od testovanej chemikálie pred jej kvantifikáciou (38). Z tohto dôvodu sa kontroly NSC_{liVing} alebo NSC_{killed} pri použití spektrofotometrie HPLC/UPLC nikdy nevyžadujú, nezávisle od chemikálie, ktorá sa testuje. Kontroly NSMTT by sa však predsa len mali použiť, ak existuje podozrenie, že testovaná chemikália priamo redukuje MTT alebo má farbu, ktorá bráni v hodnotení kapacity priamo redukovať MTT (ako sa opisuje v odseku 26). Pri použití spektrofotometrie HPLC/UPLC na meranie formazánu MTT sa percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva vypočíta ako percentuálny podiel plochy píku formazánu MTT, ktorý sa získa zo živých tkanív vystavených testovanej chemikálii, v porovnaní s píkom formazánu MTT získaným zo súbežnej negatívnej kontroly.// V prípade testovaných chemikálií, ktoré majú schopnosť priamo redukovať MTT, sa skutočná životaschopnosť tkaniva vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaný zo živých tkanív vystavených testovanej chemikálii mínus % NSMTT. Takisto je potrebné poznamenať, že chemikálie, ktoré priamo redukujú MTT, ktoré by takisto mohli farebne interferovať a ktoré po ošetrení zostávajú v tkanivách a redukujú MTT tak silno, že to má za následok optické hustoty (pri použití štandardného merania OD) alebo plochy píku (pri použití spektrofotometrie HPLC/UPLC) testovaných tkanivových extraktov, ktoré presahujú rozsah linearity spektrofotometra, takže ich nemožno hodnotiť, hoci tieto javy sa vyskytujú iba veľmi zriedkavo.

▼M8

31. Spektrofotometria HPLC/UPLC sa môže takisto používať so všetkými druhmi testovaných chemikálií (zafarbené, nezafarbené, chemikálie redukujúce MTT a chemikálie neredukujúce MTT) na meranie formazánu MTT (38). Z dôvodu rozmanitosti systémov spektrofotometrie HPLC/UPLC by sa mala kvalifikácia systému spektrofotometrie HPLC/UPLC preukázať pred jeho použitím na kvantifikáciu formazánu MTT z tkanivových extraktov prostredníctvom splnenia kritérií prijateľnosti v prípade série štandardných kvalifikačných parametrov na základe odvetvového usmernenia Amerického úradu pre potraviny a lieky (*U.S. Food and Drug Administration*) týkajúceho sa validácie bioanalytickej metódy (38)(39). Tieto kľúčové parametre a ich kritériá prijateľnosti sú uvedené v dodatku 4. Po splnení kritérií prijateľnosti vymedzených v dodatku 4 sa systém spektrofotometrie HPLC/UPLC považuje za kvalifikovaný a pripravený na meranie formazánu MTT za experimentálnych podmienok opísaných v tejto testovanej metóde.

Kritériá prijateľnosti

32. Pri každej testovacej metóde, pri ktorej sa používajú validované modely RhE, by tkanivá ošetrené negatívnou kontrolou mali vykazovať hodnoty optickej hustoty, ktoré odrážajú kvalitu tkanív podľa opisu v tabuľke 2, a nemali by sa nachádzať nižšie než historicky stanovené hranice. Tkanivá ošetrené pozitívnou kontrolou, t. j. ľadovou kyselinou octovou alebo 8N KOH, by mali odrážať schopnosť tkanív reagovať na žieravú chemikáliu za podmienok testovacieho modelu (pozri dodatok 2). Variabilita medzi tkanivovými replikátmi testovanej chemikálie a/alebo kontrolných chemikálií by mala spadať do prijateľných limitov pre každú platnú požiadavku modelu RhE (pozri dodatok 2) (napr. rozdiel v životaschopnosti medzi dvoma replikátmi tkaniva by nemal presiahnuť 30 %). Ak sa buď negatívna kontrola alebo pozitívna kontrola, ktoré sú zahrnuté v testovacom cykle, vymykajú z akceptovaných rozmedzí, testovací cyklus sa nepovažuje za kvalifikovaný a mal by sa zopakovať. Ak je variabilita testovaných chemikálií mimo definovaného rozsahu, jej testovanie by sa malo zopakovať.

Interpretácia výsledkov a prognostický model

33. Hodnoty OD získané pre každú testovanú chemikáliu by sa mali použiť na výpočet percentuálneho podielu životaschopnosti vzhľadom na výsledok negatívnej kontroly, ktorý je stanovený na úroveň 100 %. V prípade použitia spektrofotometrie HPLC/UPLC sa percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva vypočíta ako percentuálny podiel plochy píku formazánu MTT, ktorý sa získa zo živých tkanív vystavených testovanej chemikálii, v porovnaní s píkom formazánu MTT získaným na základe súbežnej negatívnej kontroly. Referenčné prahové hodnoty percentuálneho podielu životaschopnosti buniek, ktoré umožňujú rozlišovanie žieravých a nežieravých testovaných chemikálií (alebo rozlišovanie medzi rôznymi podkategóriami žieravín), sú vymedzené ďalej v odsekoch 35 a 36 pre každý z testovacích modelov, na ktoré sa vzťahuje táto testovacia metóda, a mali by sa použiť na interpretáciu výsledkov.

34. V prípade testovanej chemikálie s jednoznačnou výslednou klasifikáciou by mal postačovať jeden testovací cyklus, ktorý zahŕňa použitie aspoň dvoch replikátov tkaniva. V prípadoch s hraničnými výsledkami, napríklad ak sa nezhodujú merania replikátov, sa môže zvážiť vykonanie druhého testovacieho cyklu, ako aj tretieho testovacieho cyklu, ak sa výsledky z prvých dvoch cyklov nezhodujú.

35. Prognostický model testovacieho modelu poleptania kože EpiSkin™ (9)(34)(22), spojený s klasifikačným systémom UN GHS/CLP, je uvedený v tabuľke 4:

▼M8

Tabuľka 4

Prognostický model EpiSkin™

Životaschopnosť meraná v časových bodoch expozície (t = 3, 60 a 240 minút)	Prognóza na zváženie
< 35 % po expozícii trvajúcej 3 minúty	**Žieravina:** • Nepovinná podkategória 1A (*)
≥ 35 % po expozícii trvajúcej 3 minúty **A** < 35 % po expozícii trvajúcej 60 minút **ALEBO** ≥ 35 % po expozícii trvajúcej 60 minút **A** < 35 % po expozícii trvajúcej 240 minút	**Žieravina:** • Kombinácia nepovinných podkategórií 1B a 1C
≥ 35 % po expozícii trvajúcej 240 minút	**Nežieravá chemikália**

(*) Podľa údajov vygenerovaných vzhľadom na posúdenie užitočnosti testovacích modelov RhE na podporu zaraďovania do podkategórií sa preukázalo, že približne 22 % výsledkov testovacieho modelu EpiSkin™ v rámci podkategórie 1A môže skutočne predstavovať látky/zmesi podkategórie 1B alebo podkategórie 1C (t. j. prípady zaradenia do vyššej kategórie) (pozri dodatok 3).

36. Prognostické modely na testovacie modely poleptania kože EpiDerm™ SCT (10)(23)(35), SkinEthic™ RHE (17)(18) (23) (36) a epiCS® (16)(23)(37), spojené s klasifikačným systémom GHS OSN/CLP, sú uvedené v tabuľke 5:

Tabuľka 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE a epiCS®

Životaschopnosť meraná po časových bodoch expozície (t = 3 minúty a 60 minút)	Prognóza na zváženie
KROK 1 v prípade EpiDerm™ SCT, v prípade SkinEthic™ RHE a epiCS®	
< 50 % po expozícii trvajúcej 3 minúty	**Žieravina**
≥ 50 % po expozícii trvajúcej 3 minúty **A** < 15 % po expozícii trvajúcej 60 minút	**Žieravina**
≥ 50 % po expozícii trvajúcej 3 minúty **A** ≥ 15 % po expozícii trvajúcej 60 minút	**Nežieravá chemikália**
KROK 2 v prípade EpiDerm™ SCT – v prípade látok/zmesí, ktoré sa v kroku 1 identifikujú ako žieraviny	
< 25 % po expozícii trvajúcej 3 minúty	Nepovinná podkategória 1A*
≥ 25 % po expozícii trvajúcej 3 minúty	Kombinácia nepovinných podkategórií 1B a 1C
KROK 2 v prípade SkinEthic™ RHE – v prípade látok/zmesí, ktoré sa v kroku 1 identifikujú ako žieraviny	
< 18 % po expozícii trvajúcej 3 minúty	Nepovinná podkategória 1A*

▼M8

Životaschopnosť meraná po časových bodoch expozície (t = 3 minúty a 60 minút)	Prognóza na zváženie
KROK 1 v prípade EpiDerm™ SCT, v prípade SkinEthic™ RHE a epiCS®	
≥ 18 % po expozícii trvajúcej 3 minúty	Kombinácia nepovinných podkategórií 1B a 1C
KROK 2 v prípade epiCS® – v prípade látok/zmesí, ktoré sa v kroku 1 identifikujú ako žieraviny	
< 15 % po expozícii trvajúcej 3 minúty	Nepovinná podkategória 1A*
≥ 15 % po expozícii trvajúcej 3 minúty	Kombinácia nepovinných podkategórií 1B a 1C

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje

37. Pri každom teste by sa mali do tabuľky zaznamenať údaje z jednotlivých replikátov tkaniva (napr. hodnoty optickej hustoty a vypočítaný percentuálny podiel životaschopnosti buniek pre každú testovanú chemikáliu vrátane klasifikácie), a to podľa vhodnosti aj vrátane údajov o opakovaných pokusoch. Okrem toho by sa pri každom teste mali oznámiť stredné hodnoty a rozpätia životaschopnosti a variačných koeficientov (CV) medzi replikátmi tkaniva. Pri každej testovanej chemikálii by sa mali oznámiť pozorované interakcie s reakčným činidlom MTT prostredníctvom priamych reduktantov MTT alebo zafarbených testovaných chemikálií.

Správa o teste

38. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testované chemikálie a kontrolné chemikálie:

— jednozložková látka: identifikácia chemikálie, napr. názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak je to vhodné a prakticky uskutočniteľné atď.,

— viaczložková látka, UVCB a zmes: charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— zdroj, číslo dávky, ak je k dispozícii,

— prípadná úprava testovanej chemikálie/kontrolnej látky pred testovaním (napr. zahrievanie, drvenie),

— stabilita testovanej chemikálie, konečný dátum použitia alebo dátum opätovnej analýzy, ak je známy,

— podmienky skladovania.

Použitý model RhE a protokol a jeho odôvodnenie (ak je to uplatniteľné)

Podmienky testovania:

— použitý model RhE (vrátane čísla šarže),

▼**M8**

— údaje o kalibrácii zariadenia na meranie (napr. spektrofotometer), vlnová dĺžka a pásmový filter (ak je to uplatniteľné) použitý na kvantifikáciu formazánu MTT, a rozsah linearity zariadenia na meranie,

— opis metódy použitej na kvantifikáciu formazánu MTT,

— opis kvalifikácie systému spektrofotometrie HPLC/UPLC, ak je to uplatniteľné,

— úplné podporné údaje o konkrétnom použitom modeli RhE vrátane jeho výkonnosti. K nim by mali patriť okrem iného:

i) životaschopnosť,

ii) bariérová funkcia,

iii) morfológia,

iv) reprodukovateľnosť a prediktívna schopnosť,

v) kontroly kvality modelu (QC),

— odkaz na historické údaje o modeli. K nim by mala okrem iného patriť prijateľnosť údajov o kontrole kvality s odkazom na historické údaje o šaržiach,

— preukázanie spôsobilosti vykonávať testovaciu metódu pred bežným použitím prostredníctvom testovania chemikálií na preukázanie spôsobilosti.

Testovací postup:

— podrobné údaje o použitom testovacom postupe (vrátane postupov umývania použitých po expozičnom období);

— dávky použitej testovanej chemikálie a použitých kontrolných chemikálií,

— trvanie expozičného(-ých) času(-ov) a teplota(-y) expozície,

— indikácia kontrol použitých v prípade priamych reduktantov MTT a/alebo sfarbených testovaných chemikálií, ak je to uplatniteľné,

— počet replikátov tkaniva použitých pri každej testovanej chemikálii a kontrolách (PC, negatívna kontrola, NSMTT, NSCliving a NSCkilled, ak je to uplatniteľné), na každý čas expozície,

— opis rozhodovacích kritérií/prognostického modelu, ktoré sa uplatňujú vzhľadom na použitý model RhE,

— opis všetkých modifikácií testovacieho postupu (vrátane postupov umývania).

Testovací cyklus a kritériá prijateľnosti testu

— pozitívnu a negatívnu kontrolu predstavujú stredné hodnoty a rozsahy prijateľnosti založené na historických údajoch,

— prijateľná variabilita medzi replikátmi tkaniva v prípade pozitívnych a negatívnych kontrol,

▼**M8**

— prijateľná variabilita medzi replikátmi tkaniva v prípade testovanej chemikálie.

Výsledky:

— tabuľkový zápis údajov týkajúcich sa jednotlivých testovaných chemikálií a kontrol pri každom expozičnom čase, každom testovacom cykle a každom meraní replikátu, a to vrátane optickej hustoty alebo plochy píku formazánu MTT, percentuálneho podielu životaschopnosti tkaniva, stredného percentuálneho podielu životaschopnosti tkaniva, rozdielov medzi replikátmi, SD a/alebo CV, ak je to uplatniteľné,

— ak je to uplatniteľné, výsledky kontrol použitých v prípade chemikálií priamo redukujúcich MTT a/alebo zafarbených testovaných chemikálií, a to vrátane optickej hustoty alebo plochy píku formazánu MTT, % NSMTT, % NSCliving, % NSCkilled, rozdielov medzi replikátmi tkaniva, SD a/alebo CV (ak je to uplatniteľné), a konečný správny percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva,

— výsledky získané s testovanou(-ými) chemikáliou(-ami) a kontrolnými chemikáliami vo vzťahu k definovanému testovaciemu cyklu a kritériám prijateľnosti testu,

— opis ďalších pozorovaných účinkov,

— odvodená klasifikácia v súvislosti s prognostickým modelom/rozhodovacími kritériami, ktoré sa používajú.

Rozbor výsledkov

Závery

LITERATÚRA

(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) Kapitola B.4 tejto prílohy, Akútne podráždenie, poleptanie kože.

(3) Kapitola B.40 tejto prílohy, Poleptanie kože *in vitro*.

(4) Kapitola B.65 tejto prílohy, Metóda na testovanie s využitím membránovej bariéry *in vitro*.

(5) Kapitola B.46 tejto prílohy, Podráždenie kože *in vitro*: Test na modeli rekonštruovanej ľudskej pokožky.

(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 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol.In Vitro* 19: 925-929.

(17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann,H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., 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 1000 (epiCS®) CellSystems.

(38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., 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

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: Miera zhody výsledkov testovacej metódy a akceptovaných referenčných hodnôt. Ide o mieru výkonnosti testovacej metódy a jedno z rozhodujúcich hľadísk. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (25).

Životaschopnosť buniek: Parameter na meranie celkovej aktivity bunkovej populácie, ako je napríklad schopnosť bunkových mitochondriálnych dehydrogenáz redukovať vitálne farbivo MTT [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium bromid, tiazolylová modrá)], ktorý v závislosti od posledného meraného koncového bodu a od použitého plánu testovania zodpovedá celkovému počtu a/alebo vitalite živých buniek.

Chemikália: látka alebo zmes.

Zhoda: Ide o mieru výkonnosti testovacej metódy pri testovacích metódach, ktoré poskytujú jednoznačný výsledok, a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa niekedy používa zameniteľne s pojmom presnosť a vymedzuje sa ako podiel všetkých testovaných chemikálií, ktoré sú správne klasifikované ako pozitívne alebo negatívne. Zhoda je vo vysokej miere závislá od prevalencie pozitívnych výsledkov v typoch testovaných chemikálií, ktoré sa skúmajú (25).

ET_{50}: Môže sa odhadnúť stanovením expozičného času potrebného na zníženie životaschopnosti buniek o 50 % pri použití referenčnej chemikálie v určenej pevne stanovenej koncentrácii (pozri takisto IC_{50}).

GHS [Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií]: systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálneho, zdravotného a environmentálneho nebezpečenstva a označovanie pomocou príslušných komunikačných prvkov, ako sú piktogramy, signalizačné výrazy, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o ich nežiaducich účinkoch v záujme ochrany ľudí (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a záchranných zložiek) a životného prostredia (1).

HPLC: vysoko účinná kvapalinová chromatografia.

IATA: integrovaný prístup k testovaniu a hodnoteniu.

IC_{50}: Môže sa odhadnúť stanovením koncentrácie, pri ktorej referenčná chemikália znižuje životaschopnosť tkanív o 50 % (IC_{50}) po pevne stanovenom expozičnom čase (pozri takisto ET_{50}).

Nekonečná dávka: Množstvo testovanej chemikálie aplikovanej na pokožku, ktoré prekračuje množstvo potrebné na úplné a rovnomerné pokrytie povrchu pokožky.

Zmes: zmes alebo roztok, ktoré sú zložené z dvoch alebo viacerých látok, ktoré spolu nereagujú.

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej 80 hm. %.

▼**M8**

MTT: 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium-bromid; tiazolylová modrá tetrazólium-bromid.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii > 10 hm. % a < 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo ku chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

NC: nežieravá.

Kontrola NSC_{kille}d: nešpecifická farebná kontrola v usmrtených tkanivách.

Kontrola NSC_{living}: nešpecifická farebná kontrola v živých tkanivách.

NSMTT: nešpecifická redukcia MTT.

OD: optická hustota.

PC: pozitívna kontrola, replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému, ktorý je ošetrený chemikáliou so známou schopnosťou vyvolať pozitívnu odozvu. Aby sa zabezpečila možnosť hodnotenia variability odozvy pozitívnej kontroly v priebehu času, rozsah pozitívnej odozvy by nemal byť nadmerný.

Výkonnostné normy (Performance standards – PS): normy založené na validovanej testovacej metóde, ktoré slúžia ako základ na hodnotenie porovnateľnosti navrhovanej testovacej metódy, ktorá je mechanicky a funkčne podobná. Patria sem: i) nevyhnutné zložky testovacej metódy; ii) minimálny zoznam referenčných chemikálií vybraných spomedzi chemikálií používaných na preukázanie prijateľnej výkonnosti validovanej testovacej metódy; a iii) porovnateľné úrovne presnosti a spoľahlivosti založené na tom, čo sa získalo pri validovanej testovacej metóde a čo by navrhovaná testovacia metóda mala preukázať pri hodnotení pomocou minimálneho zoznamu referenčných chemikálií (25).

Relevantnosť: opis vzťahu testovacej metódy k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej testovacia metóda správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testovacej metódy (25).

Spoľahlivosť: vyjadruje rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda v priebehu času reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, ak sa pri nej používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti (25).

Testovací cyklus: Testovací cyklus pozostáva z jednej alebo viacerých testovacích chemikálií, ktoré sa testujú súbežne s negatívnou kontrolou a s PC.

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií správne klasifikovaných testovacou metódou. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje jednoznačné výsledky, pričom ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (25).

▼**M8**

Poleptanie kože *in vivo*: vznik nevratného poškodenia kože; konkrétne ide o viditeľnú nekrózu cez pokožku až do kože po aplikácii testovanej chemikálie, a to až do štyroch hodín. Pre reakcie v dôsledku poleptania sú typické vredy, krvácanie, krvavé chrasty a na konci pozorovania po 14 dňoch zmena farby v dôsledku vyblednutia kože, celé plochy postihnuté alopéciou a jazvy. Na vyhodnotenie problematických lézií by sa malo uvažovať o histopatológii.

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií správne klasifikovaných testovacou metódou. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje jednoznačné výsledky, a ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (25).

Látka: chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie stability látky a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ale s vylúčením všetkých rozpúšťadiel, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo bez zmeny jej zloženia.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje touto testovacou metódou.

UPLC: ultravysokoúčinná kvapalinová chromatografia.

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

▼M8

Dodatok 2

HLAVNÉ ZLOŽKY TESTOVACÍCH MODELOV RHE, KTORÉ SÚ VALIDOVANÉ NA TESTOVANIE POLEPTANIA KOŽE

Zložky testovacích modelov	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Povrch modelu	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Počet replikátov tkaniva	Prinajmenšom 2 na expozičný čas	2 – 3 na expozičný čas	Prinajmenšom 2 na expozičný čas	Prinajmenšom 2 na expozičný čas
Dávky a aplikácia pri ošetrení	Kvapaliny a viskózne: 50 µl ±3 µl (131,6 µl/cm^2) Tuhé: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ±5µl NaCl solution (9 g/l) Voskovité/lepivé: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) s nylonovým sitkom	Kvapaliny: 50 µl (79,4 µl/cm^2) s nylonovým sitkom alebo bez neho *Kompatibilita testovanej chemikálie s nylonovým sitkom pred testom* Polotuhé: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Tuhé: 25 µl H_2O (alebo viac, ak je to potrebné) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Vosky: plochá diskovitá platnička s priemerom cca 8 mm umiestnená na povrch tkaniva zvlhčeného15 µl H_2O.	Kvapaliny a viskózne: 40 µl ±3µl (80 µl/cm^2) s použitím s nylonového sitka *Kompatibilita testovanej chemikálie s nylonovým sitkom pred testom* Tuhé: 20 µl ±2µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Voskovité/lepivé: 20 ±3 mg (40 mg/cm^2) s použitím s nylonového sitka	Kvapaliny: 50 µl (83,3 µl/cm^2) s použitím s nylonového sitka *Kompatibilita testovanej chemikálie s nylonovým sitkom pred testom* Polotuhé: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Tuhé: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (alebo viac, ak je to potrebné) Voskovité: ploché teliesko podobné sušienke s priemerom cca 8 mm umiestnené na povrchu tkaniva, ktoré bolo zvlhčené 15 µl H_2O
Predbežná kontrola v prípade priamej redukcie MTT	50 µl (kvapalina) alebo 20 mg (tuhá) + 2 ml MTT 0,3 mg/ml roztoku na 180 ± 5 min. pri 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → ak sa roztok sfarbí do modra/purpurova, mali by sa vykonať prispôsobené kontroly usmrtené vodou	50 µl (kvapalina) alebo 25 mg (tuhá) + 1 ml MTT 1 mg/ml roztoku na 60 min pri 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → ak sa roztok sfarbí do modra/purpurova, mali by sa vykonať prispôsobené kontroly usmrtené zmrazením	40 µl (kvapalina) alebo 20 mg (tuhá) + 1 ml MTT 1 mg/ml roztoku na 180± 15 min. pri 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → ak sa roztok sfarbí do modra/purpurova, mali by sa vykonať prispôsobené kontroly usmrtené zmrazením	50 µl (kvapalina) alebo 25 mg (tuhá) + 1 ml MTT 1 mg/ml roztoku na 60 min pri 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → ak sa roztok sfarbí do modra/purpurova, mali by sa vykonať prispôsobené kontroly usmrtené zmrazením

▼M8

Zložky testovacích modelov	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Predbežná kontrola v prípade farebnej interferencie	10 µl (kvapalina) alebo 10 mg (tuhá látka) + 90 µl H_2O sa miešajú počas 15 min. pri teplote miestnosti → ak sa roztok sfarbí, mali by sa vykonať živé prispôsobené kontroly	50 µl (kvapalina) alebo 25 mg (tuhá) + 300 µl H_2O počas 60 min. pri 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → ak sa roztok sfarbí, mali by sa vykonať živé prispôsobené kontroly	40 µl (kvapalina) alebo 20 mg (tuhá forma) + 300 µl H_2O miešané 60 min. pri izbovej teplote (RT) → ak je testovacia chemikália farebná, mali by sa vykonať živé prispôsobené kontroly	50 µl (kvapalina) alebo 25 mg (tuhá) + 300 µl H_2O počas 60 min. pri 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → ak sa roztok sfarbí, mali by sa vykonať živé prispôsobené kontroly
Expozícia čas a teplota	3 min., 60 min. (± 5 min.) a 240 min. (± 10 min.) vo vetranej skrini izbová teplota (RT, 18 – 28°C)	3 min. pri RT a 60 min pri 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min. pri RT a 60 min pri 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min. pri RT a 60 min pri 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH
Oplachovanie	25 ml 1x PBS (2 ml/ponorenie)	20 krát stálym jemným prúdom 1x PBS	20 krát stálym jemným prúdom 1x PBS	20 krát stálym jemným prúdom 1x PBS
Negatívna kontrola	50 µl roztoku NaCl (9 g/l) testuje sa pri každom expozičnom čase	50 µl H_2O testuje sa pri každom expozičnom čase	40 µl H_2O testuje sa pri každom expozičnom čase	50 µl H_2O testuje sa pri každom expozičnom čase
Pozitívna kontrola	50 µl ľadovej kyseliny octovej testuje sa iba 4 hodiny	50 µl 8N KOH testuje sa pri každom expozičnom čase	40 µl 8N KOH testuje sa iba 1 hodinu	50 µl 8N KOH testuje sa pri každom expozičnom čase
Roztok MTT	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Inkubácia MTT čas a teplota	180 min. (± 15 min.) pri 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min pri 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min. (±15 min.) pri 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min pri 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH

▼M8

Zložky testovacích modelov	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Extrakčné rozpúšťadlo	500 µl acidifikovaného izopropanolu (0,04 N HCl v izopropanole) (úplne ponorené izolované tkanivo)	2 ml izopropanolu (extrakcia z hornej a spodnej vloženej časti)	1,5 ml izopropanolu (extrakcia z hornej a spodnej vloženej časti)	2 ml izopropanolu (extrakcia z hornej a spodnej vloženej časti)
Čas a teplota pri extrakcii	Cez noc pri RT, chránené pred svetlom	Cez noc bez trepania pri RT alebo počas 120 min. s trepaním (~120 rpm) pri RT	Cez noc bez trepania pri RT alebo počas 120 min. s trepaním (~120 rpm) pri RT	Cez noc bez trepania pri RT alebo počas 120 min. s trepaním (~120 rpm) pri RT
Merané hodnoty OD	570 nm (545 – 595 nm) bez referenčného filtra	570 nm (alebo 540 nm) bez referenčného filtra	570 nm (540 – 600 nm) bez referenčného filtra	540 – 570 nm bez referenčného filtra
Kontrola kvality tkaniva	18-hodinové ošetrenie SDS 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	ošetrenie 1 % Triton X-100 4,08 hodiny ≤ ET_{50} ≤ 8,7 hodiny	ošetrenie 1 % Triton X-100 4,0 hodiny ≤ ET_{50} ≤ 10,0 hodiny	ošetrenie 1 % Triton X-100 2,0 hodiny ≤ ET_{50} ≤ 7,0 hodiny
Kritériá prijateľnosti	1. Stredná hodnota OD replikátov tkaniva ošetrených negatívnou kontrolou by mala byť ≥ 0,6 a ≤ 1,5 pri každom čase expozície 2. Stredná hodnota životaschopnosti replikátov tkaniva vystavených na 4 hodiny s pozitívnou kontrolou (ľadová kyselina octová), vyjadrená ako % negatívnej kontroly, by mala byť ≤ 20 % 3. V rozmedzí 20 – 100 % životaschopnosti a v prípade hodnôt OD ≥ 0,3 by rozdiel v životaschopnosti medzi dvoma replikátmi tkaniva nemal presiahnuť 30 %).	1. Stredná hodnota OD replikátov tkaniva ošetrených negatívnou kontrolou (H_2O) by mala byť ≥ 0,8 a ≤ 2,8 pri každom expozičnom čase 2. Stredná hodnota životaschopnosti replikátov tkaniva vystavených na 1 hodinu s pozitívnou kontrolou (8N KOH), vyjadrená ako % negatívnej kontroly, by mala byť < 15 % 3. V rozmedzí 20 – 100 % životaschopnosti by variačný koeficient (CV) medzi replikátmi tkaniva mal byť ≤ 30 %	1. Stredná hodnota OD replikátov tkaniva ošetrených negatívnou kontrolou (H_2O) by mala byť ≥ 0,8 a ≤ 3,0 pri každom expozičnom čase 2. Stredná hodnota životaschopnosti replikátov tkaniva vystavených na 1 hodinu (a 4 hodiny, ak je to uplatniteľné) s pozitívnou kontrolou (8N KOH), vyjadrená ako % negatívnej kontroly, by mala byť < 15 % 3. V rozmedzí 20 – 100 % životaschopnosti a v prípade hodnôt OD ≥ 0,3 by rozdiel v životaschopnosti medzi dvoma replikátmi tkaniva nemal presiahnuť 30 %).	1. Stredná hodnota OD replikátov tkaniva ošetrených negatívnou kontrolou (H_2O) by mala byť ≥ 0,8 a ≤ 2,8 pri každom expozičnom čase 2. Stredná hodnota životaschopnosti replikátov tkaniva vystavených na 1 hodinu s pozitívnou kontrolou (8N KOH), vyjadrená ako % negatívnej kontroly, by mala byť < 20 % 3. V rozmedzí 20 – 100 % životaschopnosti a v prípade hodnôt OD ≥ 0,3 by rozdiel v životaschopnosti medzi dvoma replikátmi tkaniva nemal presiahnuť 30 %).

▼M8

Dodatok 3

VÝKONNOSŤ TESTOVACÍCH MODELOV NA ÚČELY ZARAĎOVANIA DO PODKATEGÓRIÍ

V ďalej uvedenej tabuľke sa uvádza výkonnosť štyroch testovacích modelov vypočítaná na základe súboru 80 chemikálií testovaných štyrmi autormi testov. Výpočty vykonal sekretariát OECD a podskupina odborníkov ich preskúmala a odsúhlasila (21) (23).

Na základe modelov testovania EpiSkin™, EpiDerm™ , SkinEthic™ a epiCS® je možné ďalej kategorizovať (t. j. 1A verzus 1B a 1C verzus NC).

Výkonnosť, miera zaraďovania do vyšších kategórií, miera zaraďovania do nižších kategórií a presnosť (prediktívna schopnosť) štyroch testovacích modelov na základe súboru 80 chemikálií, z ktorých sa všetky testujú v 2 alebo 3 testovacích cykloch pri každom testovacom modeli:

ŠTATISTICKÉ ÚDAJE TÝKAJÚCE SA PROGNÓZ, KTORÉ SA ZÍSKALI V SÚVISLOSTI S CELÝM SÚBOROM CHEMIKÁLIÍ

[n = 80 chemikálií testovaných v 2 nezávislých testovacích cykloch v prípade epiCS® (159 (*) klasifikácií) alebo v 3 nezávislých testovacích cykloch v prípade EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ a SkinEthic™ RHE (240 klasifikácií)].

	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Prípady zaradenia do vyšších kategórií:				
1B a 1C zaradené do vyššej kategórie 1A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
NC zaradená do vyššej kategórie 1B a 1C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
NC zaradená do vyššej kategórie 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
zaradená do vyššej kategórie žieravín	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Celková miera zaradenia do vyšších kategórií (všetky kategórie)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Prípady zaradenia do nižších kategórií:				
1A zaradená do nižšej kategórie 1B a 1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A zaradená do nižšej kategórie NC	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B a 1C zaradená do nižšej kategórie NC	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Celková miera zaradenia do nižších kategórií (všetky kategórie)	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**
Správne klasifikácie:				
1A klasifikovaná správne	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
1B a/1C klasifikovaná správne	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
NC klasifikovaná správne	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Celková presnosť	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

NC: Nežieravá chemikália

(*) jedna chemikália bola v prípade epiCS® testovaná len raz z dôvodu nedostupnosti (23)

▼**M8**

Dodatok 4

Kľúčové parametre a kritériá prijateľnosti na kvalifikáciu systému spektrofotometrie HPLC/UPLC na meranie formazánu MTT extrahovaného z tkaniva RhE

Parameter	Protokol vyvodený z usmernenia FDA (37) (38)	Akceptačné kritériá
Selektívnosť	analýza izopropanolu, living blank = životnosť neovplyvnených RhE tkanív (izopropanolový extrakt zo živých tkanív RhE bez akéhokoľvek ošetrenia), dead blank = životnosť mŕtvych neovplyvnených RhE tkanív (izopropanolový extrakt z usmrtených tkanív RhE bez akéhokoľvek ošetrenia)	Plocha interferencie ($Area_{interference}$) ≤ 20 % plochy LLOQ ($Area_{L-LOQ}$) ([1])
Exaktnosť	kontroly kvality (t. j. formazán MTT pri 1,6 µg/ml, 16 µg/ml a 160 µg/ml) v izopropanole (n = 5)	CV ≤ 15 % alebo ≤ 20 % v prípade LLOQ
Presnosť	kontroly kvality v izopropanole (n = 5)	% Dev ≤ 15 % alebo ≤ 20 % v prípade LLOQ
Matricový efekt	kontroly kvality v living blank (n = 5)	85 % ≤ matricový efekt % ≤ 115 %
Prenos	analýza izopropanolu po štandarde ULOQ ([2])	$Plocha_{interferencia}$ ≤ 20 % $plochy_{LLOQ}$
Reprodukovateľnosť (počas dňa)	3 nezávislé kalibračné krivky (založené na 6 za sebou nasledujúcich 1/3 zriedeniach formazánu MTT v izopropanole so začiatkom na ULOQ, t. j. 200 µg/ml); kontroly kvality v izopropanole (n = 5)	kalibračné krivky: % Dev ≤ 15 % alebo ≤ 20 % v prípade LLOQ kontroly kvality: % Dev ≤ 15 % a CV ≤ 15 %
Reprodukovateľnosť (medzidňová)	Deň 1: 1 kalibračná krivka a kontroly kvality v izopropanole (n = 3) Deň 2: 1 kalibračná krivka a kontroly kvality v izopropanole (n = 3) Deň 3: 1 kalibračná krivka a kontroly kvality v izopropanole (n = 3)	
Krátkodobá stabilita formazánu MTT v tkanivovom extrakte RhE	Kontroly kvality v living blank (n = 3) analyzované v deň prípravy a po 24 hodinách skladovania pri izbovej teplote	% Dev ≤ 15 %
Dlhodobá stabilita formazánu MTT v tkanivovom extrakte RhE, ak sa vyžaduje	Kontroly kvality v living blank (n = 3) analyzované v deň prípravy a po niekoľkých dňoch skladovania pri stanovenej teplote (napr. 4 °C, – 20 °C, – 80 °C)	% Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: dolný kvantifikačný limit, vymedzený na pokrytie 1 – 2 % životaschopnosti tkaniva, t. j. 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ: horný kvantifikačný limit, vymedzený tak, aby bol prinajmenšom dvakrát vyšší ako najvyššia očakávaná koncentrácia formazánu MTT v izopropanolových extraktoch z negatívnych kontrol, t. j. 200 µg/ml.

▼B

B.41. **TEST FOTOTOXICITY 3T3 NRU *IN VITRO***

1. **METÓDA**

Táto metóda je ekvivalentná OECD TG 432 (2004).

1.1. ÚVOD

Fototoxicita sa definuje ako toxická odozva na látku aplikovanú na telo, ktorá je buď vyvolaná, alebo zvýšená (je zjavná pri nižších úrovniach dávok) po následnej expozícii svetlu, alebo ktorá je vyvolaná ožiarením kože po systémovom podaní chemickej látky.

Test fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* sa používa na identifikáciu fototoxického potenciálu testovanej látky vyvolaného chemickou látkou excitovanou po expozícii svetlu. Týmto testom sa vyhodnocuje foto-cytotoxicita pomocou relatívneho zníženia životaschopnosti buniek exponovaných účinkom chemickej látky jednak v prítomnosti a jednak v neprítomnosti svetla. Látky identifikované týmto testom sú pravdepodobne fototoxické *in vivo* po systémovej aplikácii a distribúcii do kože, alebo po lokálnej aplikácii.

Uvádza sa, že mnohé druhy chemických látok indukujú fototoxické účinky (1), (2), (3), (4). Spoločnou črtou je ich schopnosť absorbovať svetelnú energiu slnečného svetla. Podľa prvého fotochemického zákona (Grotthaus-Draperov zákon) je fotoreakcia podmienená dostatočnou absorpciou svetelných kvánt. Pred zvažovaním biologického testovania sa preto musí stanoviť absorpčné spektrum testovanej chemickej látky v oblasti U V/viditeľného svetla v súlade s usmernením OECD Test Guideline 101. Vychádza sa z toho, že ak je mólový extinkčný/absorpčný koeficient nižší ako 10 litrov × mol^{-1} × cm^{-1}, daná chemická látka pravdepodobne nie je fotoreaktívna. Takúto chemickú látku nie je potrebné testovať testom fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* ani iným biologickým testom na nepriaznivé fotochemické účinky (1), (5). Pozri aj prílohu 1.

Nedávno boli vyhodnotené spoľahlivosť a význam testu fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* (6), (7), (8), (9). Ukázalo sa, že test fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* je prediktívny, pokiaľ ide o akútne fototoxické účinky na zvieratá a ľudí *in vivo.* Test nie je určený na predikciu ďalších nepriaznivých účinkov, ktoré môžu vzniknúť zo spoločného pôsobenia chemickej látky a svetla, napr. neumožňuje skúmať fotogenotoxicitu, fotoalergiu ani fotokarcinogenitu, ani neumožňuje posúdiť fototoxický potenciál. Okrem toho tento test nie je určený na riešenie nepriamych mechanizmov fototoxicity ani účinkov metabolitov testovanej látky alebo účinkov zmesí.

Keďže použitie metabolizujúcich systémov je všeobecnou požiadavkou pri všetkých testoch *in vitro* určených na predikciu genotoxického a karcinogénneho potenciálu, v prípade fototoxikológie existujú iba zriedkavé prípady, keď je potrebná metabolická transformácia na to, aby chemická látka pôsobila ako fototoxín *in vivo* alebo *in vitro.* Nepokladá sa teda za potrebné ani za vedecky opodstatnené, aby sa tento test vykonával s použitím systému metabolickej aktivácie.

▼B

1.2. VYMEDZENIE POJMOV

Intenzita ožiarenia: intenzita ultrafialového (UV) alebo viditeľného svetla dopadajúceho na povrch, meraná v jednotkách W/m^2 alebo mW/cm^2.

Dávka svetla: množstvo (= intenzita × čas) ultrafialového (UV) alebo viditeľného žiarenia dopadajúceho na povrch a vyjadreného v jouloch (= W × s) na plochu povrchu, napr. J/m^2 alebo J/cm^2.

Vlnové pásma UV svetla: označenia odporúčané CIE (Medzinárodná komisia pre osvetlenie – Commission Internationale de L'Eclairage) sú tieto: UVA (315 – 400 nm), UVB (280 – 315 nm) a UVC (100 – 280 nm). Používajú sa aj iné označenia; rozlíšenie medzi UVB a UVA sa často kladie na 320nm a UVA možno rozdeliť na UV-A1 a UV-A2 s hranicou približne na 340 nm.

Životaschopnosť buniek: parameter, ktorým sa meria celková aktivita bunkovej populácie (napr. absorbovanie vitálneho farbiva neutrálna červeň do bunkových lyzozómov), ktorý v závislosti od posledného merania a použitej testovacej metódy je v korelačnom vzťahu s celkovým počtom buniek a/alebo ich vitalitou.

Relatívna životaschopnosť buniek: životaschopnosť buniek vyjadrená vo vzťahu k rozpúšťadlovým (negatívnym) kontrolným vzorkám, ktoré boli odoberané počas celého testovacieho postupu (buď +Irr, alebo –Irr), ale bez aplikovania testovanej chemickej látky.

PIF *(Photo-Irritation-Factor – koeficient svetelnej dráždivosti):* koeficient vytvorený porovnaním dvoch rovnako účinných cytotoxických koncentrácií (IC_{50}) testovanej chemickej látky získanej za neprítomnosti (-Irr) a za prítomnosti (+Irr) necytotoxického ožiarenia UV A/vis svetlom.

IC_{50}: koncentrácia testovanej chemickej látky, ktorou sa životaschopnosť bunky zníži o 50 %.

MPE *(Mean-Photo-Effect* – **stredný svetelný účinok):** veličina odvodená z matematickej analýzy priebehu kriviek odozvy na koncentráciu, získaných za neprítomnosti (–Irr) a za prítomnosti (+Irr) necytotoxického žiarenia UV A/vis svetlom.

Fototoxicita: akútna toxická odozva, ktorá je vyvolaná po prvej expozícii kože určitým chemikáliám a následnej expozícii svetlu, alebo ktorá je podobne vyvolaná ožiarením kože po systémovom podávaní chemickej látky.

1.3. PODSTATA TESTOVACEJ METÓDY

Test fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* je založený na porovnaní cytotoxicity chemickej látky pri testovaní s expozíciou necytotoxickej dávky simulovaného slnečného svetla a bez tejto expozície. Cytotoxicita je v tomto teste vyjadrená ako koncentračne závislé zníženie absorpcie vitálneho farbiva neutrálna červeň (NR), meraná 24 hodín po pôsobení testovanej chemickej látky a ožiarenia (10). NR je slabé katiónové farbivo, ktoré ľahko preniká cez bunkové membrány nedifúznym spôsobom, pričom sa akumuluje vnútrobunkovo v lyzozómoch. Zmeny bunkového povrchu citlivej lyzozomálnej membrány vedú k lámavosti lyzozómov a iným zmenám, ktoré sa postupne stávajú nevratnými. Také zmeny vyvolané pôsobením xenobiotík vedú k zníženiu absorpcie a viazaniu NR. Preto je možné rozlišovať medzi životaschopnými a poškodenými alebo mŕtvymi bunkami, čo je základom tohto testu.

▼B

Bunky Balb/c 3T3 sa kultivujú počas 24 hodín, aby sa vytvorili monomolekulové vrstvy. Dve 96-jamkové doštičky na jednu testovanú chemickú látku sa 1 hodinu predinkubujú ôsmimi rôznymi koncentráciami testovanej látky. Potom sa jedna z týchto dvoch doštičiek exponuje najvyššej necytotoxickej dávke ožiarenia, kým druhá doštička sa udržiava v tme. V obidvoch doštičkách sa potom pôsobiace médium nahradí kultivačným médiom a po ďalších 24 hodinách inkubácie sa stanoví životaschopnosť buniek pomocou absorpcie neutrálnej červene. Životaschopnosť buniek sa vyjadruje ako percentuálny podiel vzhľadom na výsledok neupravenej rozpúšťadlovej kontrolnej vzorky a vypočíta sa pre každú z testovacích koncentrácií. Na predikciu fototoxického potenciálu sa porovnajú odozvy koncentrácií získané pri ožiarení a bez ožiarenia, zvyčajne na úrovni IC_{50}, t. j. pri koncentrácii, ktorou sa znižuje životaschopnosť buniek na 50 % v porovnaní s neupravovanými kontrolnými vzorkami.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1 **Prípravne práce**

1.4.1.1. *Bunky*

Pri validačnej štúdii sa použila permanentná myšia fibroplastová bunková línia Balb/c 3T3, klon 31, buď z banky kultúr amerického typu (ATCC – American Type Culture Collection), Manassas, Vigínia, USA, alebo z európskej banky bunkových kultúr (ECACC – European Collection of Cell Cultures), Salisbury, grófstvo Wiltshire, Spojené Kráľovstvo, a preto sa odporúča získať bunky z riadne kvalifikovaného depozitára buniek. Pri tom istom testovacom procese sa môžu použiť iné bunky alebo bunkové línie, ak sú kultivačné podmienky prispôsobené špecifickým potrebám buniek, ale musí byť preukázaná ich rovnocennosť.

Bunky by sa mali pravidelne kontrolovať, či nedošlo k mykoplazmovej kontaminácii a použiť iba vtedy, ak sa kontaminácia nezistí (11).

Je dôležité pravidelne kontrolovať citlivosť buniek na UV podľa postupu kontroly kvality opísanom v tejto metóde. Keďže citlivosť buniek na UVA môže s počtom pasáží stúpať, mali by sa použiť bunky Balb/c 3T3 s najnižším dosiahnuteľným počtom pasáží, najlepšie menej ako 100. (Pozri 1.4.2.2.2. a prílohu 2.)

1.4.1.2. *Médiá a kultivačné podmienky*

Na rutinné pasážovanie buniek a počas testovacieho postupu by sa mali používať vhodné kultivačné médiá a inkubačné podmienky, napr. pre bunky Balb/c 3T3 sú to DMEM (Dulbeccova modifikácia Eagleovho média – Dulbecco's Modified Eagle's Medium) obohatenú 10 % sérom z novonarodeného teľaťa, 4 mM glutamínom, penicilínom (100 IU), a streptomycínom (100 μg/ml), a o inkubáciu v zvlhčenom prostredí pri 37 °C s 5 – 7,5 % CO_2 v závislosti od použitého pufra (pozri časť 1.4.1.4 druhý pododsek). Osobitne dôležité je kultivačnými podmienkami bunky zabezpečiť, aby bunkový časový cyklus bol v rámci bežného doterajšieho rozsahu pre použité bunky alebo bunkovú líniu.

1.4.1.3 *Príprava kultúr*

Bunky zo zmrazených kmeňových kultúr sa nasadia do kultivačného média v primeranej hustote a pred použitím v teste fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* sa najmenej raz subkultivujú.

▼B

Bunky používané pri teste fototoxicity sa nasadia do kultivačného média v primeranej hustote tak, aby do konca testu nedošlo ku konfluencii kultúr, t. j. do okamihu, keď sa po 48 hodinách od nasadenia stanovuje životaschopnosť buniek. V prípade buniek Balb/c 3T3, ktoré sa pestujú v 96-jamkových doštičkách, sa odporúča hustota nasadenia 1×10^4 buniek na jamku.

Pre každú testovanú chemickú látku sa bunky rovnakým spôsobom nasadia do dvoch samostatných 96-jamkových doštičiek, ktoré sa potom súbežne podrobia celému testovaciemu postupu za rovnakých kultivačných podmienok, s výnimkou času, keď sa jedna z doštičiek ožiari (+Irr) a druhá sa ponechá v tme (–Irr).

1.4.1.4 *Príprava testovanej látky*

Testované látky musia byť tesne pred použitím čerstvo pripravené, pokiaľ sa však údajmi nepreukáže ich stabilita pri skladovaní. Odporúča sa, aby sa každá manipulácia s chemikáliami a počiatočné ošetrenie buniek vykonávali za takých svetelných podmienok, ktoré by pred ožiarením zabránili fotoaktivácii alebo degradácii testovanej látky.

Testované chemické látky sa rozpustia v pufrovaných soľných roztokoch, napr. v Earlovom rovnovážnom soľnom roztoku (EBSS), alebo v iných fyziologicky rovnovážnych pufrových roztokoch, ktoré nesmú obsahovať bielkovinové zložky, zložky absorbujúce svetlo, (napr. pH indikátory farby a vitamíny), aby sa predišlo interferencii počas ožarovania. Keďže bunky sa počas ožarovania držia približne 50 minút mimo inkubátora v atmosfére obsahujúcej CO_2, je potrebné dbať na to, aby sa zabránilo alkalizácii. Ak sa používajú slabé pufre ako napr. EBSS, možno to dosiahnuť inkubovaním buniek v atmosfére obsahujúcej 7,5 % CO_2. Ak sú bunky inkubované v atmosfére obsahujúcej iba 5 % CO_2, mal by sa zvoliť silnejší pufer.

Testované chemické látky s obmedzenou rozpustnosťou vo vode by mali byť rozpustené vo vhodnom rozpúšťadle. Ak sa použije rozpúšťadlo, musí byť prítomné v konštantnom objeme vo všetkých kultúrach, t. j. v negatívnych (rozpúšťadlových) kontrolných vzorkách, ako aj vo všetkých koncentráciách testovanej chemickej látky a pri tejto koncentrácii musí byť necytotoxické. Koncentrácie testovanej chemickej látky by sa mali zvoliť tak, aby sa zabránilo zrážaniu alebo zakaleniu roztoku.

Odporúčanými rozpúšťadlami sú dimetylsulfoxid (DMSO) a etanol (ETOH). Vhodné môžu byť aj iné rozpúšťadlá s nízkou cytotoxicitou. Všetky rozpúšťadlá by sa pred použitím mali posúdiť z hľadiska ich špecifických vlastností, napr. reakcie s testovanou chemickou látkou, zmierňovania fototoxického účinku, vlastnosti v súvislosti so zachytávaním radikálov a/alebo chemickej stability v rozpúšťadle.

Rozpúšťanie sa môže uľahčiť vírivým miešaním a/alebo pôsobením ultrazvuku, a/alebo zahriatím na príslušné teploty, pokiaľ sa to nedotkne stability testovanej chemickej látky.

▼B

1.4.1.5 *Podmienky ožarovania*

1.4.1.5.1. Zdroj svetla

Pri testovaní fototoxicity je rozhodujúcim faktorom výber vhodného svetelného zdroja a filtrov. Svetlo v pásme UVA a vo viditeľnom pásme sa zvyčajne spája s fototoxickými reakciami *in vivo* (3), (12), zatiaľ čo žiarenie v pásme UVB je menej relevantné, ale je veľmi cytotoxické; cytotoxicita sa zvyšuje 1 000-krát pri posune vlnovej dĺžky z 313 na 280 nm (13). Kritériá výberu vhodného svetelného zdroja musia zahŕňať požiadavku, aby svetelný zdroj vysielal svetlo s vlnovými dĺžkami, ktoré testovaná chemická látka absorbuje (absorpčné spektrum) a aby dávka svetla (dosiahnuteľná v priebehu primeraného expozičného času) bola dostatočná na detekciu známych fotocytotoxických chemických látok. Ďalej, použité vlnové dĺžky a dávky by nemali mať neprimerane zhubné účinky na testovací systém, napr. emisiou tepla (infračervená oblasť).

Za optimálny zdroj umelého svetla sa pokladá simulácia slnečného svetla pomocou solárnych simulátorov. Distribúcia ožarovacieho výkonu filtrovaného solárneho simulátora by mala byť blízka vonkajšiemu dennému svetlu uvedenému v (14). V solárnych simulátoroch sa používajú jednak xenónové výbojky, a jednak vysokotlakové ortuťovo-kovové halogénové výbojky (15). Druhá z nich má tú výhodu, že vyžaruje menej tepla a je lacnejšia, ale slnečné svetlo napodobňuje menej dokonale než xenónová výbojka. Pretože všetky solárne simulátory vyžarujú významné množstvá UVB žiarenia, mali by byť vhodným spôsobom filtrované s cieľom stlmiť vysoko cytotoxické vlnové dĺžky UVB. Vzhľadom na to, že bunkové kultúry plastových materiálov obsahujú UV stabilizátory, spektrum by sa malo merať pomocou rovnakého druhu veka 96-jamkovej doštičky, ako sa bude používať pri skúške. Bez ohľadu na opatrenia prijaté na stlmenie častí spektra pomocou filtrovania alebo filtračnými účinkami zariadenia, ktorým sa nemožno vyhnúť, spektrum zaznamenané pod týmito filtrami by sa nemalo líšiť od normalizovaného denného svetla vo vonkajšom prostredí (14). Príklad distribúcie spektrálneho vyžarovania filtrovaného solárneho simulátora použitého vo validačnej štúdii testu fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* sa uvádza v literatúre (8), (16). Pozri aj prílohu 2 obrázok 1.

1.4.1.5.2. Dozimetria

Intenzita svetla (intenzita ožarovania) by sa mala pravidelne kontrolovať pred každým testom fototoxicity s použitím vhodného širokopásmového UV-merača. Táto intenzita by sa mala merať cez rovnaký druh veka 96-jamkovej doštičky, aký sa použije počas skúšky. Tento UV-merač musí byť kalibrovaný na zdroj. Funkčnosť UV-merača by sa mala kontrolovať a na tento účel sa odporúča použiť druhý, referenčný UV-merač rovnakého druhu s totožnou kalibráciou. V ideálnom prípade by sa mal v dlhších časových odstupoch použiť spektrorádiometer na zmeranie spektrálneho vyžarovania filtrovaného svetelného zdroja a na kontrolu kalibrácie širokopásmového UV-merača.

Dávka 5 J/cm^2 (meraná v pásme UVA) bola stanovená ako necytotoxická pre bunky Balb/c 3T3 a ako dostatočne silná na excitáciu chemických látok tak, aby vyvolávali fototoxické reakcie (6), (17), napr. na dosiahnutie 5 J/cm^2 počas 50 minút bolo vyžarovanie upravené na hodnotu 1,7 mW/cm^2. Pozri prílohu 2 obrázok 2. Ak sa používa iná bunková línia alebo odlišný svetelný zdroj, je možné, že dávka vyžarovania sa bude musieť kalibrovať tak, aby sa mohol zvoliť režim dávkovania, ktorý nebude mať zhubný účinok na bunky, ale bude dostatočný na excitovanie štandardných fototoxínov. Čas svetelnej expozície sa vypočíta týmto spôsobom:

▼B

$$t\ (\text{min}) = \frac{\text{dávka ožiarenia } (J/cm^2) \times 1000}{\text{ožiarenie } (mW/cm^2) \times 60} \qquad (1\ J = 1\ Wsec)$$

1.4.2. **Testovacie podmienky**

1.4.2.1. Koncentrácie testovanej látky

Rozmedzia koncentrácií chemickej látky testovanej so svetlom (+Irr) a bez svetla (–Irr) by mali byť vhodne stanovené v rámci experimentov na zistenie rozsahu dávky. Môže byť užitočné posúdiť rozpustnosť na začiatku a po 60 minútach (alebo podľa toho, aký čas úpravy sa používa), keďže rozpustnosť sa môže meniť v čase alebo v priebehu expozície. Hodnota pH bunkových kultúr s pridanou testovanou chemickou látkou mala byť v rozsahu 6,5 – 7,8, aby bola vylúčená toxicita vyvolaná nevhodnými kultivačnými podmienkami alebo vysoko kyslými či zásaditými chemickými látkami.

Najvyššia koncentrácia testovanej látky by sa mala byť zlučiteľná s fyziologickými testovacími podmienkami, napr. mal by byť vylúčený osmotický stres a stres z pH. V závislosti od testovanej chemickej látky môže byť potrebné vziať do úvahy ďalšie fyzikálno-chemické vlastnosti ako sú faktory obmedzujúce najvyššiu testovaciu koncentráciu. V prípade relatívne nerozpustných látok, ktoré nie sú toxické pri koncentráciách až do bodu nasýtenia, mala by sa testovať najvyššia dosiahnuteľná koncentrácia. Vo všeobecnosti by sa malo vylúčiť zrážanie testovanej chemickej látky pri akýchkoľvek testovacích koncentráciách. Maximálna koncentrácia testovanej látky by nemala presiahnuť 1 000 μg/ml; osmolarita by nemala presiahnuť 10 mmol. Mali by sa použiť geometrické rady riedenia 8 koncentrácií testovanej látky s konštantným faktorom riedenia (pozri časť 2.1 druhý odsek).

Ak existujú údaje (z experimentu na zistenie rozsahu), že testovaná chemická látka nie je cytotoxická až do limitnej koncentrácie pri pokuse v tme (–Irr), ale je vysoko cytotoxická pri ožiarení (+Irr), rozsahy koncentrácií, ktoré sa musia zvoliť na pokus (+Irr), sa môžu líšiť od rozsahov zvolených pre (–Irr) pokus, aby sa splnila požiadavka dostatočnej kvality údajov.

1.4.2.2. *Kontroly*

1.4.2.2.1. Radiačná citlivosť buniek, zistenie doterajších údajov:

Citlivosť buniek na svetelný zdroj by sa mala pravidelne kontrolovať (približne každý piata pasáž) pomocou posúdenia ich životaschopnosti po expozícii narastajúcim dávkam ožiarenia. Pri tomto posudzovaní by sa malo použiť niekoľko dávok ožiarenia vrátane úrovní podstatne vyšších, ako sú úrovne používané pri teste fototoxicity 3T3 NRU. Tieto dávky sú najľahšie stanoviteľné meraniami UV častí svetelného zdroja. Bunky sa nasadia pri hustote používanej pri teste fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* a ožarujú sa nasledujúci deň. Životaschopnosť bunky sa potom stanoví o deň neskôr s použitím absorpcie neutrálnej červene. Malo by preukázať, že výsledná najvyššia necytotoxická dávka (napr. v rámci validačnej štúdie: 5 J/cm^2 [UVA]) bola dostatočná na správnu klasifikáciu referenčných chemických látok (tabuľka 1).

▼B

1.4.2.2.2. Radiačná citlivosť, kontrola prebiehajúceho testu:

Test spĺňa kritériá kvality, keď ožiarené negatívne/rozpúšťadlové kontrolné vzorky vykazujú životaschopnosť vyššiu ako 80 % v porovnaní s experimentom v tme s neožiarenou negatívnou/rozpúšťadlovou kontrolnou vzorkou.

1.4.2.2.3. Životaschopnosť kontrolných vzoriek rozpúšťadla:

Absolútna optická hustota ($OD_{540\ NRU}$) neutrálnej červene extrahovanej z kontrolných vzoriek rozpúšťadla udáva, či 1×10^4 buniek nasadených do každej jamky vyrástlo v bežnom čase zdvojnásobenia počas dvoch dní skúšky. Test spĺňa kritériá prijateľnosti, ak je stredná hodnota $OD_{540\ NRU}$ pre neexponované vzorky $\geq 0{,}4$ (t. j. približne dvadsaťnásobok absorbancie rozpúšťadlového pozadia).

1.4.2.2.4. Pozitívna kontrola:

Známa fototoxická chemická látka sa testuje súbežne s každým testom fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*. Odporúča sa chlórpromazín (CPZ). Pre CPZ testovaný podľa štandardného protokolu pri teste fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* sa definovali tieto kritériá prijateľnosti testu: pre CPZ ožiarený (+Irr): IC_{50} = 0,1 až 2,0 µg g/ml, pre CPZ neožiarený (–Irr): IC_{50} = 7,0 až 90,0 µg/ml. Koeficient svetelnej dráždivosti (PIF) by mal byť > 6. Mala by sa monitorovať predchádzajúca funkčnosť tejto pozitívnej kontroly.

Namiesto chlórpromazínu sa môžu používať ako súbežné pozitívne porovnávacie vzorky aj iné fototoxické chemické látky, vhodné pre chemickú triedu alebo vlastnosti rozpustnosti vyhodnocovanej chemickej látky.

1.4.3. **Postup testovania (6), (7), (8), (16), (17):**

1.4.3.1. Prvý deň:

Do obvodových jamiek 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky tkanivových kultúr sa odpipetuje 100 µl kultivačného média (= slepé vzorky). Do zostávajúcich jamiek sa nadávkuje 100 µl bunkovej suspenzie s koncentráciou 1×10^5 buniek/ml do kultivačného média (= 1×10^4 buniek/jamka). Pre každú sériu koncentrácií jednotlivej testovanej látky a pre rozpúšťadlové a pozitívne porovnávacie vzorky by sa mali pripraviť dve doštičky.

Bunky sa inkubujú 24 hodín (pozri časť 1.4.1.2), až kým nevytvoria polosplývajúcu monomolekulovú vrstvu. Táto doba inkubácie umožňuje regeneráciu buniek, ich priľnavosť a exponenciálny rast.

1.4.3.2. Druhý deň:

Po inkubácii sa kultivačné médium z buniek dekantuje a opatrne premyje so 150 µl pufrovaného roztoku použitého na inkubáciu. Pridá sa 100 µl pufra obsahujúceho vhodnú koncentráciu testovanej chemickej látky alebo rozpúšťadla (kontrola rozpúšťadlom). Aplikuje sa 8 rôznych koncentrácií testovanej chemickej látky. Bunky sa testovanou chemickou látkou inkubujú v tme počas 60 minút (pozri časť 1.4.1.2 a druhý odsek v časti 1.4.1.4).

Vyberie sa jedna z dvoch doštičiek pripravených na každú sériu koncentrácií testovanej látky a porovnávacích vzoriek, spravidla náhodne, na stanovenie cytotoxicity (–Irr) (t. j. kontrolná doštička), a jedna (expozičná doštička) na stanovenie fotocytotoxicity (+Irr).

▼B

Na vykonanie expozície +Irr sa bunky pri izbovej teplote počas 50 minút ožarujú cez veko 96-jamkovej doštičky najvyššou dávkou žiarenia, ktorá je necytotoxická (pozri taktiež prílohu 2). Neožiarené doštičky (–Irr) sa uchovávajú pri izbovej teplote v tmavej škatuli 50 minút (= doba expozície účinkom svetla).

Testovací roztok sa dekantuje a dôkladne dvakrát premyje so 150 ul pufrovaného roztoku použitého na inkubáciu, ale neobsahujúceho testovaný materiál. Pufer sa nahradí kultivačným médiom a inkubuje sa (pozri časť 1.4.1.2) cez noc (18 – 22 hodín).

1.4.3.3 Tretí deň:

1.4.3.3.1. Vyhodnotenie mikroskopom

Bunky by sa mali preskúmať pomocou mikroskopu s fázovým kontrastom vzhľadom na ich rast, morfológiu a integritu monomolekulovej vrstvy. Zmeny v morfológii bunky a účinky na rast bunky by sa mali zaznamenať.

1.4.3.3.2. Test absorpcie neutrálnej červene

Bunky sa premyjú so 150 µl predhriateho pufra. Premývací roztok sa odstráni jemným poklepávaním. Pridá sa 100 µl neutrálnej červene s koncentráciou 50 µg/ml neutrálnej červene (NR) *(N8, N8,* 3-trimetyl-2, 8-fenazíndiamín monohydrochlorid, EINECS číslo 209-035-8; CAS číslo 553-24-2; C.I. 50040) do média bez séra (16) a 3 hodiny sa inkubuje spôsobom opísaným v časti 1.4.1.2. Po inkubácii sa médium NR odstráni a bunky sa premyjú so 150 µl pufra. Ten sa dekantuje a prebytočný pufer sa odstráni odsatím alebo odstredením.

Pridá sa presne 150 µl desorbčného roztoku NR (čerstvo pripravený v zložení 49 dielov vody + 50 dielov etanolu + 1 diel kyseliny octovej).

Mikrotitračná doštička sa jemne trepe na trepačke mikrotitračných doštičiek počas 10 minút, až do vy extrahovaní a NR z buniek a vytvorenia homogénneho roztoku.

Spektrofotometrom sa zmeria optická hustota extraktu NR pri 540 nm, pričom sa na porovnanie použije slepá skúška. Údaje sa uložia vo vhodnom formáte elektronického súboru na účely následnej analýzy.

2. **ÚDAJE**

2.1. KVALITA A KVANTITA ÚDAJOV

Údaje z testovania by mali umožniť zmysluplnú analýzu závislosti odozvy na koncentrácii získanej pri ožarovaní a bez neho, a pokiaľ je to možné, koncentrácii testovanej chemickej látky, pri ktorej je životaschopnosť buniek znížená na 50 % (IC_{50}). Ak sa zistí cytotoxicita, mal by sa rozsah koncentrácií a interval medzi jednotlivými koncentráciami nastaviť tak, aby to umožnilo zladiť krivku s experimentálnymi údajmi.

Pre jasne pozitívne ako aj pre jasne negatívne výsledky (pozri časť 2.3 prvý odsek) môže postačovať primárny experiment podporený jedným alebo viacerými predbežnými experimentmi na stanovenie rozsahu dávok.

▼B

Nepreukazné, hraničné alebo nejasné výsledky by sa mali objasniť ďalším testovaním (pozri aj časť 2.4 druhý odsek). V takýchto prípadoch by sa mala zvážiť modifikácia experimentálnych podmienok. Medzi experimentálne podmienky, ktoré by sa možno mohli modifikovať, patrí rozsah či odstup koncentrácií, čas predinkubácie a čas expozície ožiareniu. Pre chemické látky nestabilné vo vode môže byť vhodný kratší expozičný čas.

2.2. VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Na umožnenie vyhodnotenia údajov sa môže vypočítať koeficient svetelnej dráždivosti (PIF) alebo stredný svetelný účinok (MPE).

Pri výpočte parametrov fotocytotoxicity (pozri ďalej) sa súbor diskrétnych hodnôt závislost odozvy na koncentrácii musí aproximovať s použitím vhodnej spojitej krivky koncentračnej závislosti odozvy (vhodným modelom). Zladenie krivky s údajmi sa zvyčajne vykonáva metódou nelineárnej regresie (18). Na posúdenie vplyvu variability údajov na zladenú krivku sa odporúča samozavádzací postup *(bootstrap)*.

Koeficient svetelnej dráždivosti (PIF) sa vypočíta pomocou tohto vzorca:

$$\mathrm{PIF} = \frac{\mathrm{IC}_{50}(-\mathrm{Irr})}{\mathrm{IC}_{50}(+\mathrm{Irr})}$$

Ak IC_{50} za prítomnosti alebo za neprítomnosti svetla nemožno vypočítať, nemožno pre testovaný materiál stanoviť PIF. Stredný svetelný účinok (MPE) je založený na porovnaní úplných kriviek závislosti odozvy na koncentrácii (19). Je definovaný ako vážený priemer celého reprezentatívneho súboru hodnôt svetelného účinku.

$$\mathrm{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i \mathrm{PE}_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Svetelný účinok PE_c pri každej koncentrácii C sa definuje ako súčin účinku odozvy RE_c a účinku koncentrácie DE_c, t. j. $PE_c = RE_c \times DE_c$. Účinok odozvy RE_c predstavuje rozdiel medzi odozvami pozorovanými za prítomnosti a za neprítomnosti svetla, t. j. $RE_c = R_c\ (-Irr) - R_c\ (+Irr)$. Účinok dávky je daný vzťahom

$$\mathrm{DE}_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

pričom C* predstavuje koncentráciu ekvivalencie, t. j. koncentráciu, pri ktorej je odozva na +Irr rovnaká ako odozva na –Irr pri koncentrácii C. Ak C* nemožno stanoviť, pretože hodnoty odozvy krivky +Irr sú sústavne vyššie alebo nižšie ako hodnoty R_c (–Irr), tak hodnota účinku dávky sa stanoví na hodnotu 1. Váhové faktory wi sú dané najvyššou hodnotou odozvy, t. j. $w_i = \mathrm{MAX}\ \{R_i\ (+Irr), R_i\ (-Irr)\}$. Súradnicová sieť pre koncentrácie C; sa zvolí tak, aby v koncentračnom intervale definovanom hodnotami koncentrácií použitými v rámci experimentu bol rovnaký počet bodov. Výpočet MPE je obmedzený na maximálnu hodnotu koncentrácie, pri ktorej aspoň jedna z dvoch kriviek stále vykazuje hodnotu odozvy najmenej 10 %. Ak je táto maximálna koncentrácia vyššia ako najvyššia koncentrácia použitá v rámci +Irr experimentu, zvyšná časť + Irr krivky sa nastaví na hodnotu odozvy „0“. V závislosti od toho, či je, alebo nie je MPE hodnota vyššia ako riadne zvolená hraničná hodnota (MPE_c0,15), chemická látka je alebo nie je klasifikovaná ako fototoxická.

▼B

Program na výpočet PIF a MPE je dostupný v (20).

2.3. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Na základe validačnej štúdie (8) sa pri testovanej látke s PIF < 2 alebo MPE < 0,1 predikuje: „žiadna fototoxicita“. PIF > 2 a < 5 alebo MPE > 0,1 a < 0,15 predikuje: „pravdepodobná fototoxicita“ a PIF > 5 alebo MPE > 0,15 predikuje: „fototoxicita“.

Pre každé laboratórium zavádzajúce po prvýkrát túto skúšku by sa mali referenčné materiály uvedené v tabuľke 1 testovať pred testovaním testovaných chemických látok na posúdenie fototoxicity. Hodnoty PIF alebo MPE by sa mali približovať hodnotám uvedeným v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Chemický názov	Číslo EINECS	Číslo CAS	PIF	MPE	Najvyššia úroveň absorpcie	Rozpúšťadlo (1)
aminodaron HCL	243-293-2	[19774-82-4]	>3,25	0,27-0,54	242 nm 300 nm (rameno)	etanol
chloropromazín HCL	200-701-3	[69-09-0]	>14,4	0,33-0,63	309 nm	etanol
norfloxacín	274-614-4	[70458-96-7]	>71,6	0,34-0,90	316 nm	acetonitril
antracén	204-371-1	[120-12-7]	>18,5	0,19-0,81	356 nm	acetonitril
protoporfyrin IX, dvojsodný	256-815-9	[50865-01-5]	>45,3	0,54-0,74	402 nm	etanol
L-histidín		[7006-35-1]	bez PIF	0,05-0,10	211 nm	voda
hexacholorofén	200-733-8	[70-30-4]	1,1–1,7	0,00-0,05	299 nm 317 nm (rameno)	etanol
laurylsulfát sodný	205-788-1	[151-21-3]	1,0–1,9	0,00-0,05	bez absorpcie	voda

(1) Rozpúšťadlo použité na meranie absorpcie.

2.4. INTERPRETÁCIA ÚDAJOV

Ak sa fototoxické účinky pozorujú iba pri najvyššej testovacej koncentrácii, (najmä v prípade testovaných chemických látok rozpustných vo vode) na posúdenie nebezpečnosti môžu byť potrebné ďalšie odhady. Tie sa môžu týkať údajov o absorpcii kožou a akumulácii chemikálie v koži a/alebo údajov z iných testov, napr. z testovania chemickej látky na zvieracej alebo ľudskej koži *in vitro,* alebo na modeloch kože.

▼B

Ak sa nepreukáže toxicita (+Irr a –Irr) a ak sú koncentrácie, ktoré sa mohli testovať, obmedzené malo rozpustnosťou, tak sa môže spochybniť kompatibilita testovanej látky s testom a malo by sa uvažovať o potvrdzujúcom testovaní s použitím napr. iného modelu.

3. **SPRÁVY**

SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať aspoň tieto informácie:

Testovaná látka:

— identifikačné údaje, bežné generické názvy a čísla IUPAC a CAS, ak sú známe,

— fyzikálna povaha a čistota,

— fyzikálno-chemické vlastnosti relevantné na vykonanie štúdie,

— absorpčné spektrum UV/vis,

— stabilita a fotostabilita, ak sú známe.

Rozpúšťadlo:

— zdôvodnenie výberu rozpúšťadla,

— rozpustnosť testovanej chemickej látky v rozpúšťadle,

— percentuálny podiel rozpúšťadla prítomného v aplikačnom médiu.

Bunky:

— typ a zdroj buniek,

— neprítomnosť mykoplazmy,

— počet bukových pasáží, ak je známy,

— radiačná citlivosť buniek stanovená ožarovacím zariadením použitým pri teste fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*.

Testovacie podmienky (1); *inkubáciapred aplikáciou a po nej:*

— typ a zloženie kultivačného média,

— inkubačné podmienky (koncentrácia CO_2; teplota; vlhkosť),

— trvanie inkubácie (predinkubačné kroky; poinkubačné kroky).

Testovacie podmienky (2); *aplikácia chemickej látky:*

— zdôvodnenie výberu koncentrácií testovaných chemických látok používaných pri ožarovaní a bez neho,

— v prípade obmedzenej rozpustnosti testovanej chemickej látky a pri neprítomnosti cytotoxicity: zdôvodnenie najvyššej testovanej koncentrácie,

— typ a zloženie aplikačného média (pufrovaný soľný roztok),

— trvanie aplikácie chemickej látky.

Testovacie podmienky (3); *ožarovanie:*

— zdôvodnenie výberu použitého svetelného zdroja,

▼B

— výrobca a typ svetelného zdroja a rádiometra,

— spektrálna charakteristika žiarenia svetelného zdroja,

— transmisné a absorpčné charakteristiky použitého filtra (použitých filtrov),

— charakteristiky rádiometra a podrobnosti o jeho kalibrácii,

— vzdialenosť svetelného zdroja od testovacieho systému,

— intenzita UVA ožiarenia v tejto vzdialenosti, vyjadrená v mW/cm^2,

— trvanie expozície UV/vis svetlu,

— dávka UVA (ožiarenie x čas) vyjadrená v J/cm^2,

— teplota bunkových kultúr počas ožarovania a bunkových kultúr súbežne uchovávaných v tme.

Testovacie podmienky (4); *test životaschopnosti príjmom neutrálnej červene:*

— zloženie pôsobiaceho média neutrálnej červene,

— trvanie inkubácie neutrálnej červene,

— inkubačné podmienky (koncentrácia CO_2; teplota; vlhkosť),

— podmienky extrakcie neutrálnej červene (extrakčné činidlo; trvanie),

— vlnová dĺžka použitá na spektrofotometrické odčítanie optickej hustoty neutrálnej červene,

— druhá vlnová dĺžka (referenčná), ak sa použije,

— obsah slepého roztoku pre spektrofotometriu, ak sa použije.

Výsledky:

— životaschopnosť bunky získaná pri každej koncentrácii testovanej chemickej látky, vyjadrená v percentách strednej životaschopnosti súbežných kontrolných vzoriek rozpúšťadla,

— krivky koncentračnej závislosti odozvy (koncentrácia testovanej chemickej látky proti relatívnej životaschopnosti bunky) získané pri súbežných +Irr a –Irr pokusoch,

— analýza kriviek koncentračnej závislosti odozvy: ak je to možné, tak približný výpočet hodnôt IC_{50} (+Irr) a IC_{50} (–Irr),

— porovnanie obidvoch kriviek koncentračnej závislosti na odozvu získaných s ožarovaním a bez neho, a to buď vypočítaním koeficientu svetelnej dráždivosti (PIF), alebo vypočítaním stredného svetelného účinku (MPE),

— kritériá prijateľnosti testu; súbežná kontrola rozpúšťadlom,

— absolútna životaschopnosť (optická hustota extraktu neutrálnej červene) ožiarených a neožiarených buniek,

— doterajšie údaje pre negatívnu kontrolnú vzorku a kontrolnú vzorku rozpúšťadla; stredné hodnoty a smerodajné odchýlky,

— kritériá prijateľnosti testu; súbežná pozitívna kontrola,

▼B

— IC_{50} (+Irr) a IC_{50} (–Irr) a PIF/MPE pozitívnej kontrolnej chemickej látky,

— doterajšie údaje pozitívnej kontrolnej chemickej látky: IIC_{50} (+Irr) a IC_{50} (–Irr) a PIF/MPE; stredné hodnoty a smerodajné odchýlky.

Rozbor výsledkov

Závery

4. **ODKAZY NA LITERATÚRU**

(1) Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 95 – 102.

(2) Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In „Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry“ Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI – XXXV.

(3) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314 – 348.

(4) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In „The science of Photobiology“ Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79 – 110.

(5) OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 7 „Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water“ Environment Directorate, OECD, Paris.

(6) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, 793 – 796.

(7) Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3. November 1997, ATLA, 26, 7 – 8.

(8) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. In Vitro 12, 305 – 327.

(9) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

(10) Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, 119 – 124.

(11) Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225 – 237.

▼B

(12) Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In „Dermatotoxicology“, edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p 515 – 530.

(13) Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825 – 1829.

(14) ISO 10977. (1993). Photography – Processed photographic colour films and paper prints – Methods for measuring image stability.

(15) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275

(16) ZEBET/ECVAM/COLIPA – Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.

(17) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC,* in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679 – 708.

(18) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127 – 138.

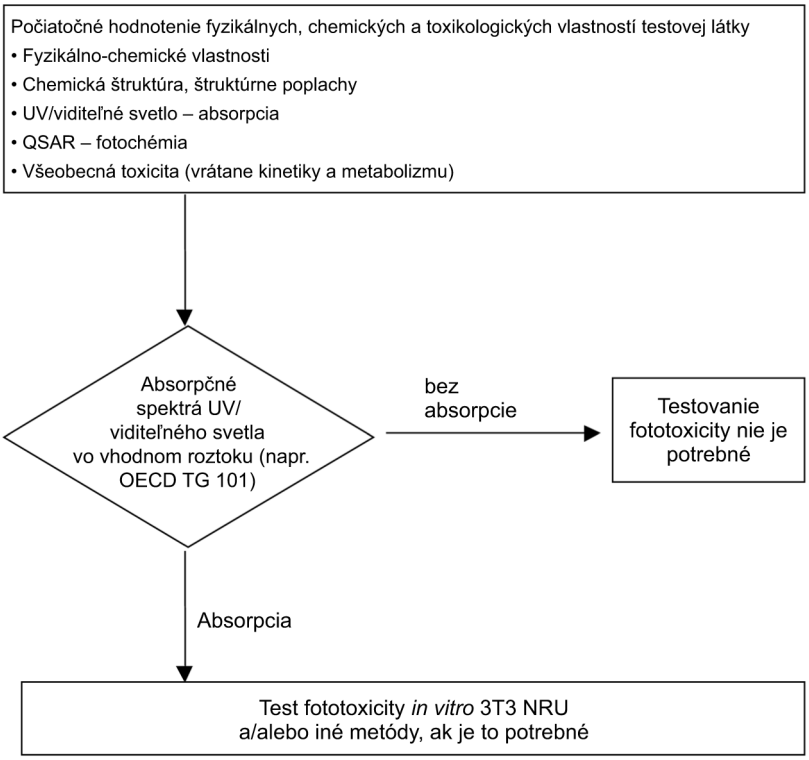
(19) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445 – 462.

(20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.htm 1

▼B

Príloha 1

Úloha testu fototoxicity 3T3 NRU v sekvenčnom prístupe na testovanie fototoxicity chemických látok

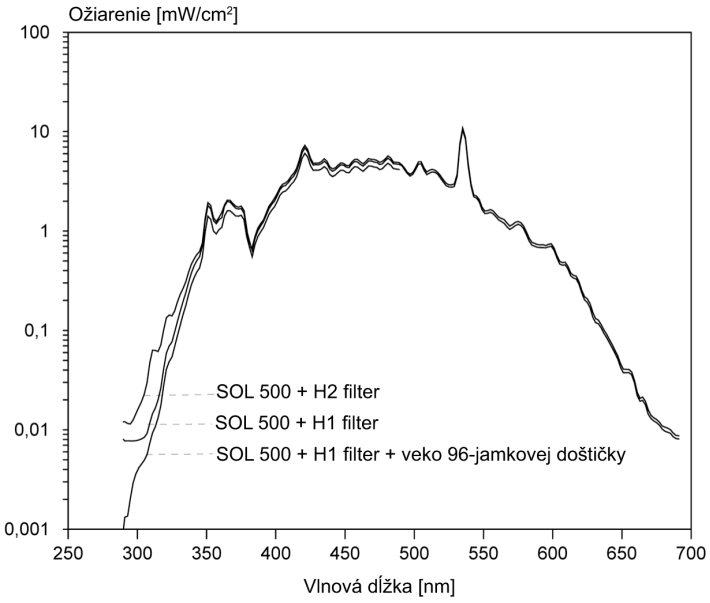


▼B

Príloha 2

Obrázok 1

Spektrálna distribúcia výkonu solárneho simulátora s filtrom



(pozri časť 1.4.1.5 druhý odsek)

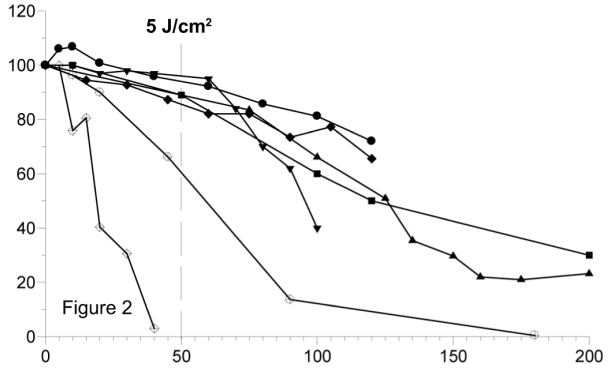
Na obrázku 1 je uvedený príklad prijateľnej spektrálnej distribúcie intenzity žiarenia solárneho simulátora s filtrom. Je zo zdroja dopovaného kovovým halogenidom, použitého pri validačnej štúdii skúšky fototoxicity 3T3 NRU (6), (8), (17). Je znázornený účinok dvoch rôznych filtrov a účinok ďalšieho filtrovania veka 96-jamkovej doštičky na bunkové kultúry. Filter H2 sa použil iba pri testovacích systémoch tolerantných k vyššej dávke UVB (test na modeli kože a foto-hemolytický test červených krviniek). Pri teste 3T3 NRU sa použil filter H1. Na obrázku je znázornené, že dodatočný filtrovací účinok veka doštičky je pozorovaný predovšetkým v oblasti UVB, pričom vekom preniká ešte stále dostatočné množstvo UVB zo spektra intenzity žiarenia na excitovanie chemických látok absorbujúcich v oblasti UVB, ako je amiodarón (pozri tabuľku 1).

▼B

Obrázok 2

Citlivosť buniek Balb/c 3T3 na ožiarenie (meraná v oblasti UVA)

Životaschopnosť buniek (% absorpcie neutrálnej červene v porovnávacích vzorkách bez svetla)



(pozri časť 1.4.1.5.2 druhý odsek, 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Citlivosť buniek Balb/c 3T3 na ožiarenie solárnym simulátorom použitým pri validačnom pokuse testu fototoxicity 3T3 NRU, nameraná v oblasti UVA. Na obrázku sú znázornené výsledky získané v rámci predvalidačnej štúdie v siedmich rôznych laboratóriách (1). Zatiaľ čo dve krivky označené neplnými symbolmi boli získané so staršími bunkami (s vysokým počtom pasáží), ktoré sa museli nahradiť novými bunkovými materiálmi, krivky s plnými symbolmi znázorňujú bunky s prijateľnou toleranciou k ožiareniu.

Z týchto údajov bola odvodená najvyššia necytotoxická dávka ožiarenia 5 J/cm^2 (vertikálna prerušovaná čiara). Horizontálna prerušovaná čiara predstavuje popritom maximálny prijateľný účinok ožiarenia uvedený v časti 1.4.2.2.

▼M3

B.42. **SENZIBILIZÁCIA KOŽE: LOKÁLNA SKÚŠKA LYMFATICKÝCH UZLÍN**

ÚVOD

1. Usmernenia Organizácie pre hospodársku spoluprácu a rozvoj (OECD) na testovanie chemikálií a testovacie metódy EÚ vychádzajúce z týchto usmernení sa pravidelne revidujú vzhľadom na vedecký pokrok, zmeny regulačných potrieb a dobré životné podmienky zvierat. Pôvodná testovacia metóda (TM) na určenie senzibilizácie kože u myší, tzv. lokálna skúška lymfatických uzlín (LLNA; usmernenie OECD na vykonávanie testov 429; kapitola B.42 tejto prílohy) už bola prijatá (1). Podrobnosti validácie LLNA a revízia prác v tejto oblasti boli uverejnené v (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Aktualizovaná LLNA je založená na hodnotení skúseností a vedeckých údajov (12). Táto testovacia metóda je druhou testovacou metódou vytvorenou na posúdenie potenciálu chemikálií (látok a zmesí) spôsobiť senzibilizáciu kože u zvierat. Prvá testovacia metóda (t. j. usmernenie OECD na vykonávanie testov 406; kapitola B.6 tejto prílohy) využíva testy s morčatami, a to maximalizačný test morčiat a Buehlerov test (13). LLNA poskytuje výhody v porovnaní s metódou B.6 a usmernením OECD na vykonávanie testov 406 (13), pokiaľ ide o dobré životné podmienky zvierat. Táto aktualizovaná testovacia metóda LLNA zahŕňa súbor noriem výkonnosti (PS) (dodatok 1), ktoré možno použiť na hodnotenie stavu validácie nových a/alebo upravených testovacích metód, ktoré sú z funkčného a mechanického hľadiska podobné LLNA v súlade so zásadami usmerňujúceho dokumentu OECD č. 34 (14).

2. LLNA skúma indukčnú fázu senzibilizácie kože a poskytuje kvantitatívne údaje vhodné na hodnotenie odozvy na dávku. Treba poznamenať, že ľahké/mierne senzibilizátory, ktoré sa odporúčajú ako vhodné chemikálie na pozitívnu kontrolu v testovacích metódach na morčatách (t. j. kapitola B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov č. 406) (13), sú tiež vhodné na použitie pri LLNA (6) (8) (15). Redukovaná lokálna skúška lymfatických uzlín (rLLNA), pri ktorej by sa mohlo využívať až o 40 % menej zvierat, je v tejto testovacej metóde tiež opísaná ako jedna z možností (16) (17) (18). Metódu rLLNA možno použiť v prípade, ak vznikla regulačná potreba potvrdiť negatívny predpoklad potenciálu senzibilizácie kože, za predpokladu, že existuje súlad so všetkými ostatnými špecifikáciami protokolov LLNA, ako je to opísané v tejto testovacej metóde. Predpoklad negatívneho výsledku by sa mal urobiť na základe všetkých dostupných informácií, ako je opísané v odseku 4. Pred použitím metódy rLLNA je potrebné poskytnúť jasné a vedecké odôvodnenia použitia tejto metódy. Ak sa pri rLLNA napriek očakávaniam dosiahne pozitívny alebo nejasný výsledok, možno bude potrebné vykonať ďalšie testovanie, aby bola možná interpretácia alebo objasnenie zistenia. Skúška rLLNA by sa nemala využívať na identifikáciu nebezpečnosti testovaných látok, ktoré spôsobujú senzibilizáciu kože v prípade, keď sú potrebné informácie o odozve na dávku, ako napríklad ďalšia kategorizácia pre nariadenie (ES) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí a globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemických látok Organizácie Spojených národov (OSN).

VYMEDZENIE POJMOV

3. Použité definície sú uvedené v dodatku 2.

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

4. LLNA poskytuje alternatívnu metódu na identifikáciu možných chemikálií spôsobujúcich senzibilizáciu kože. Neznamená to nevyhnutne, že vo všetkých prípadoch sa má použiť LLNA namiesto testu s morčatami (t. j. metóda B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13), ale skôr to, že táto skúška je rovnako hodnotná a môže sa použiť ako alternatíva, v ktorej pozitívne a negatívne výsledky vo všeobecnosti nevyžadujú ďalšie potvrdenie. Testovacie laboratórium by malo posúdiť všetky dostupné informácie o testovanej látke pred uskutočnením štúdie. Takéto informácie budú

▼M3

obsahovať identitu a chemickú štruktúru testovanej látky, jej fyzikálno-chemické vlastnosti, výsledky všetkých ostatných *in vitro* alebo *in vivo* testov toxicity s testovanou látkou a toxikologické údaje o štruktúrne príbuzných chemikáliách. Tieto informácie treba vziať do úvahy pri stanovovaní, či LLNA je pre danú látku vhodná (vzhľadom na nezlučiteľnosť obmedzených druhov chemikálií s LLNA – pozri odsek 5), a ako pomoc pri výbere dávok.

5. LLNA je metóda *in vivo*, a to znamená, že pri posúdení aktivity alergickej kontaktnej senzibilizácie sa nevylučuje používanie zvierat. Môže však umožniť zníženie počtu zvierat potrebných na tento účel. Okrem toho LLNA ponúka značné zjemnenie spôsobu, akým sa zvieratá používajú na testy alergickej kontaktnej senzibilizácie (znižuje bolesť a utrpenie zvierat). LLNA sa zakladá na posudzovaní imunologických reakcií vyvolaných chemikáliami počas indukčnej fázy senzibilizácie. Na rozdiel od testov s morčatami (t. j. metóda B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13) LLNA nevyžaduje, aby sa vyvolali reakcie dermálnej hypersenzitivity. Okrem toho LLNA nevyžaduje použitie adjuvansu ako v prípade maximalizačného testu morčiat (13). Tým LLNA znižuje bolesť a utrpenie zvierat. Napriek výhodám, ktoré LLNA má v porovnaní s metódou B.6 a usmernením OECD na vykonávanie testov 406, je potrebné uznať, že existujú určité obmedzenia, v prípade ktorých by sa mohlo vyžadovať použitie metódy B.6 alebo usmernenia OECD na vykonávanie testov 406 (13) [napr. falošné negatívne zistenia v LLNA s určitými kovmi, falošné pozitívne zistenia s určitými kožnými dráždivými látkami (ako napríklad niektoré druhy povrchovo aktívnych chemikálií) (19) (20) alebo rozpustnosť testovanej látky]. Okrem toho chemické skupiny alebo látky, ktoré obsahujú potenciálne zmätočné funkčné skupiny (21), si tiež môžu vyžadovať použitie testov s morčatami (t. j. B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406 (13). Ďalej na základe obmedzenej validačnej databázy, ktorá sa skladá predovšetkým z prípravkov na ochranu rastlín, pri LLNA je pravdepodobnejšie, že pri týchto druhoch testovacích látok sa dosiahne pozitívny výsledok ako pri teste s morčatami (22). Pri testovaní prípravkov by sa však malo vziať do úvahy zahrnutie podobných látok so známymi výsledkami ako referenčných látok na preukázanie toho, že LLNA riadne funguje (pozri odsek 16). Okrem takto identifikovaných obmedzení by sa LLNA mala uplatňovať pri testovaní všetkých látok okrem prípadov, keď tieto látky majú vlastnosti, ktoré by mohli narúšať presnosť LLNA.

PRINCÍP TESTU

6. Základným princípom, na ktorom sa LLNA zakladá, je, že senzibilizátory vyvolávajú primárnu proliferáciu lymfocytov v lymfatickej uzline v drénovanom mieste aplikácie testovanej látky. Táto proliferácia je úmerná dávke a účinnosti aplikovaného alergénu a poskytuje jednoduchý prostriedok na získanie kvantitatívneho merania senzibilizácie. Proliferácia sa meria porovnávaním priemeru proliferácie v každej pokusnej skupine s priemerom proliferácie v kontrolnej skupine, ktorej sa podáva nosič (VC). Stanoví sa pomer priemernej proliferácie v každej ošetrenej skupine a priemernej proliferácie v súbežnej kontrolnej skupine s nosičom, ktorý sa označuje ako stimulačný index (SI), a musí mať hodnotu aspoň tri pred ďalším prípadným vyhodnotením testovanej látky ako potenciálneho senzibilizátora kože. Uvedené metódy sa zakladajú na používaní rádioaktívneho značenia *in vivo* na meranie proliferácie zvýšeného počtu buniek v drénovaných ušných lymfatických uzlinách. Môžu sa však použiť iné koncové body na posúdenie počtu proliferujúcich buniek za predpokladu, že budú úplne splnené požiadavky na normy výkonnosti (dodatok 1).

▼M3

OPIS SKÚŠKY

Výber druhov zvierat

7. Vybraným druhom pre tento test je myš. Použijú sa mladé dospelé negravidné samice myši, ktoré nikdy nevrhli mláďatá, kmeňa CBA/Ca alebo CBA/J. Na začiatku štúdie by zvieratá mali byť vo veku 8 – 12 týždňov a rozdiel medzi hmotnosťami zvierat má byť minimálny a nemá byť vyšší ako 20 % priemernej hmotnosti. Alternatívne sa môžu použiť iné kmene a samce, ak sa na základe získaných údajov dá uspokojivo dokázať, že neexistujú významné odlišnosti špecifické pre kmeň a/alebo pohlavie v odozve na LLNA.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

8. Myši by sa mali umiestniť v skupinách (23), pokiaľ sa neposkytne primerané vedecké odôvodnenie ich umiestnenia jednotlivo. Teplota miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 ± 3 °C. Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 % a pokiaľ možno by nemala prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti, cieľom je, aby relatívna vlhkosť dosahovala 50 % – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

Príprava zvierat

9. Zvieratá sa vyberú náhodne a sú označené tak, aby sa umožnila jednotlivá identifikácia (ale nie formou ušných značiek), a držia sa v klietkach aspoň 5 dní pred začiatkom podávania dávok, aby sa aklimatizovali na laboratórne podmienky. Pred začatím ošetrenia sa všetky zvieratá vyšetria, aby sa zaistilo, že nemajú žiadne viditeľné kožné poranenia.

Príprava dávok

10. Chemikálie v tuhom skupenstve by sa pred podaním dávky do ucha myši mali rozpustiť alebo suspendovať v rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je to vhodné, rozriediť. Kvapalné chemikálie možno podávať priamo alebo pred podaním rozriediť. V prípade nerozpustných chemikálií, ako napríklad tých, ktoré sa vo všeobecnosti používajú ako zdravotnícke pomôcky, by sa pred podaním dávky do ucha myši mala uskutočniť zvýšená extrakcia vo vhodnom rozpúšťadle, aby sa odhalili všetky extrahovateľné zložky, ktoré sa budú testovať. Testované látky sa pripravujú každý deň okrem prípadu, keď údaje o stabilite preukazujú prijateľnosť uskladnenia.

Kontrola spoľahlivosti

11. Riadne vykonanie skúšky sa dokazuje pomocou pozitívnych kontrolných chemikálií, ktoré reagujú primeranou a reprodukovateľnou citlivosťou ako senzibilizujúce testované látky, pre ktoré je dobre charakterizovaná šírka odozvy. Odporúča sa zahrnúť súbežnú pozitívnu kontrolu, pretože to dokazuje kompetenciu laboratória úspešne vykonať každú skúšku a umožňuje posúdenie vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a porovnateľnosti. Pozitívnu kontrolu v každej štúdii vyžadujú aj niektoré regulačné orgány, a preto by používatelia mali pred vykonaním skúšky LLNA konzultovať s príslušnými orgánmi. Rutinné použitie súbežnej pozitívnej kontroly sa podporuje aj preto, aby sa predišlo potrebe ďalšieho testovania na zvieratách s cieľom splniť také požiadavky, ktoré by mohli vyplynúť z použitia periodickej pozitívnej kontroly (pozri odsek 12). Pozitívna kontrola by mala spôsobiť pozitívnu odozvu na LLNA pri úrovni expozície, pri ktorej sa očakáva nárast stimulačného indexu (SI) > 3 v porovnaní s negatívnou kontrolnou skupinou. Dávka pozitívnej kontroly by sa mala zvoliť tak, aby nespôsobila nadmerné podráždenie kože alebo

▼M3

systémovú toxicitu a aby indukcia bola reprodukovateľná, ale nie nadmerná (t. j. SI > 20 by bola nadmerná indukcia). Vhodnými pozitívnymi kontrolami sú 25 % 3-fenyl-2-hexylpropenál [číslo CAS (Chemical Abstracts Service) 101-86-0] v acetóne, olivový olej (v pomere 4: 1, objemové percentá) a 5 % benzotiazol-2-tiol (číslo CAS 149-30-4) v *N,N*-dimetylformamide (pozri dodatok 1 tabuľku 1). Môžu sa vyskytnúť okolnosti, keď sa v riadne zdôvodnených prípadoch môžu použiť iné pozitívne kontroly, ktoré spĺňajú uvedené kritériá.

12. Hoci sa odporúča súbežná pozitívna kontrolná skupina, môžu sa vyskytnúť situácie, keď môže byť vhodné periodické testovanie (t. j. v intervaloch najviac 6 mesiacov) pozitívnych kontrol v prípade tých laboratórií, ktoré vykonávajú LLNA pravidelne (t. j. LLNA vykonávajú v priebehu jedného mesiaca aspoň raz) a ktoré majú zavedenú historickú databázu pozitívnych kontrol, ktorá preukazuje schopnosť laboratória dosahovať reprodukovateľné a presné výsledky s pozitívnymi kontrolami. Primeranú odbornosť s použitím LLNA možno úspešne preukázať dosiahnutím konzistentných pozitívnych výsledkov s pozitívnou kontrolou najmenej v 10 nezávislých testoch uskutočnených v určitom primeranom období (t. j. v období kratšom ako jeden rok).

13. Súbežná pozitívna kontrolná skupina by sa mala zahrnúť vždy, keď dôjde k procedurálnej zmene v súvislosti s LLNA (napr. k zmene vyškoleného personálu, zmene materiálov a/alebo reagentov používaných pri testovacej metóde, zmene nástrojov používaných pri testovacej metóde, zmene zdroja testovaných zvierat), a takéto zmeny je potrebné zaznamenať v laboratórnych správach. Je potrebné zvážiť vplyv týchto zmien na primeranosť predtým zriadenej historickej databázy pri určovaní potreby zriadenia novej historickej databázy na zaznamenávanie konzistentnosti výsledkov pozitívnej kontroly.

14. Výskumní pracovníci by si mali uvedomiť, že rozhodnutie vykonať štúdiu pozitívnych kontrol na periodickom základe namiesto súbežných pozitívnych kontrol môže mať následky na primeranosť a prijateľnosť negatívnych výsledkov štúdie získaných bez súbežnej pozitívnej kontroly počas intervalu medzi každou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly. Ak sa dosiahne napríklad falošný negatívny výsledok v periodickej štúdii pozitívnej kontroly, negatívne výsledky získané s testovanou látkou v intervale medzi poslednou prijateľnou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly a neprijateľnou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly možno spochybniť. Dôsledky týchto výsledkov treba dôkladne zvážiť pri určovaní toho, či vykonať súbežné pozitívne kontroly alebo iba periodické pozitívne kontroly. Treba tiež zvážiť použitie menšieho počtu zvierat v súbežnej pozitívnej kontrolnej skupine, ak je to vedecky odôvodnené a ak laboratórium na základe konkrétnych laboratórnych historických údajov preukáže, že možno použiť menší počet myší (12).

15. Aj keď by sa pozitívna kontrola mala testovať v nosiči, o ktorom je známe, že vyvoláva konzistentnú odozvu (napr. acetón: olivový olej v pomere 4: 1, objemové percentá), môžu sa vyskytnúť určité regulačné situácie, v ktorých bude potrebné vykonať aj testovanie v neštandardnom nosiči (klinicky/chemicky zodpovedajúcom roztoku) (24). Ak sa súbežná pozitívna kontrola testuje v odlišnom nosiči ako testovaná látka, potom treba do testu súbežnej pozitívnej kontroly zahrnúť samostatnú kontrolnú skupinu, ktorej sa podáva nosič.

16. V prípadoch hodnotenia testovaných látok, ktoré patria do konkrétnej chemickej triedy, alebo rozsahu odoziev môžu byť užitočné aj referenčné látky, aby sa preukázalo, že testovacia metóda na zisťovanie potenciálu týchto druhov testovaných látok spôsobiť senzibilizáciu kože funguje riadne. Vhodné referenčné látky majú mať tieto vlastnosti:

— štrukturálnu a funkčnú podobnosť s triedou testovanej látky, ktorá je predmetom testovania,

— známe fyzikálne/chemické vlastnosti,

— podporné údaje z LLNA,

— podporné údaje z ďalších zvieracích a/alebo ľudských modelov.

▼M3

TESTOVACÍ POSTUP

Počet zvierat a veľkosť dávky

17. Na dávkovú skupinu sa používajú aspoň štyri zvieratá, aspoň tri koncentrácie testovanej látky a k tomu súbežná negatívna kontrolná skupina, ktorej sa podáva iba nosič pre testovanú látku, a pozitívna kontrola (súbežná alebo nedávna, podľa laboratórnych pravidiel s prihliadnutím na odseky 11 – 14). Treba zvážiť testovanie viacerých dávok pozitívnej kontroly, najmä ak sa testuje na prerušovanej báze. So zvieratami v kontrolných skupinách by sa malo zaobchádzať rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami okrem prípadov, keď sa ošetrovanie testovanou látkou nevykonáva.

18. Výber dávky a nosiča by mal byť založený na odporúčaniach uvedených v odkazoch (3) a (5). Následné dávky sa zvyčajne vyberajú z vhodných sérií koncentrácií, napr. 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atď. Výber zo sérií koncentrácií je potrebné primerane vedecky zdôvodniť. Všetky existujúce informácie o toxicite (napr. akútnej toxicite a podráždení kože), ako aj štrukturálne a fyzikálno-chemické informácie o predmetnej testovanej látke (a/alebo štrukturálne príbuzných látkach) by sa mali prípadne posúdiť výberom troch po sebe idúcich koncentrácií tak, aby najvyššia koncentrácia maximalizovala expozíciu, pričom by sa však zabránilo systémovej toxicite a/alebo nadmernému lokálnemu podráždeniu kože (3) (25). Ak tieto informácie nie sú k dispozícii, možno bude potrebné vykonať počiatočný predbežný skríningový test (pozri odseky 21 – 24).

19. Nosič by nemal ovplyvňovať výsledok testu a mal by sa vybrať na základe maximalizácie rozpustnosti s cieľom získať najvyššiu dosiahnuteľnú koncentráciu, pričom vznikne roztok/suspenzia vhodná na aplikáciu testovanej látky. Odporúčané nosiče sú: acetón: olivový olej (4: 1, objemové percentá), *N,N*-dimetylformamid, metyletylketón, propylénglykol a dimetylsulfoxid (19), ale môžu sa použiť aj iné nosiče, ak sa uvedie uspokojivé vedecké zdôvodnenie. V určitých situáciách môže byť potrebné použiť ako ďalšiu kontrolu klinicky vhodný roztok alebo komerčný prípravok, v ktorom sa testovaná látka predáva. Osobitnú pozornosť je potrebné venovať zabezpečeniu toho, aby sa hydrofilné testované látky zabudovali do systému nosiča, ktorý zvlhčuje pokožku, a rýchlo neunikli, a to začlenením vhodných rozpúšťadiel (napr. 1 % Pluronic® L92). Preto je potrebné vyhýbať sa použitiu čisto vodných nosičov.

20. Spracovanie lymfatických uzlín jednotlivých myší umožňuje posúdiť variabilitu medzi zvieratami a štatisticky porovnať rozdiel medzi meraniami testovanej látky a kontrolnej skupiny, ktorej sa podáva nosič (pozri odsek 35). Okrem toho sa po poskytnutí informácií o jednotlivých zvieratách môže prehodnotiť možnosť zníženia počtu myší v pozitívnej kontrolnej skupine (12). Navyše niektoré regulačné orgány požadujú zber údajov o jednotlivých zvieratách. Niektoré regulačné orgány však môžu považovať za prijateľné aj spojené údaje o zvieratách a v takejto situácii majú používatelia možnosť zbierať buď údaje o jednotlivých zvieratách, alebo spojené údaje o zvieratách.

Predbežný skríningový test

21. V prípade, že nie sú k dispozícii informácie na stanovenie najvyššej dávky testovanej látky (pozri odsek 18), treba vykonať predbežný skríningový test s cieľom stanoviť primeranú úroveň testovanej dávky na použitie v LLNA. Cieľom predbežného skríningového testu je poskytnúť usmernenie na výber maximálnej úrovne dávky na použitie v hlavnej štúdii LLNA v prípade, že nie sú dostupné informácie o koncentrácii, ktorá spôsobuje systémovú toxicitu (pozri odsek 23) a/alebo nadmerné lokálne podráždenie kože (pozri odsek 24). Maximálna úroveň testovanej dávky by mala obsahovať 100 % testovanej látky v prípade kvapalín alebo maximálnu možnú koncentráciu v prípade tuhých látok alebo suspenzií.

▼M3

22. Predbežný skríningový test sa vykonáva za podmienok, ktoré sú identické s hlavnou štúdiou LLNA, s tým rozdielom, že sa neposudzuje proliferácia lymfatickej uzliny a môže sa použiť menší počet zvierat na dávkovú skupinu. Navrhuje sa jedno alebo dve zvieratá na dávkovú skupinu. U všetkých myší sa každý deň pozorujú klinické príznaky systémovej toxicity alebo lokálneho podráždenia v mieste aplikácie. Telesné hmotnosti zvierat sa zaznamenajú na začiatku testu a pred usmrtením (deň 6). Obidve uši každej myši sa vyšetria, či nemajú príznaky erytému (sčervenania kože), a vyhodnotia sa podľa tabuľky 1 (25). Hrúbka ucha sa meria pomocou meradla hrúbky (napr. digitálnym mikrometrom alebo meradlom hrúbky Peacock Dial) v deň 1 (pred aplikáciou dávky), v deň 3 (približne 48 hodín po prvej dávke) a v deň 6. Okrem toho možno hrúbku ucha v deň 6 určiť na základe meraní vážením vzoriek uší, ktoré by sa malo vykonať po humánnom usmrtení zvierat. Nadmerné lokálne podráždenie kože indikuje hodnota erytému ≥ 3 a/alebo zvýšenie hrúbky ucha o ≥ 25 % v ktorýkoľvek deň merania (26) (27). Najvyššia dávka vybraná pre hlavnú štúdiu LLNA bude najbližšia nižšia dávka z predbežných skríningových sérií koncentrácií (pozri odsek 18), ktorá nespôsobuje systémovú toxicitu a/ani nadmerné lokálne podráždenie kože.

Tabuľka 1

Hodnotenia erytému

Pozorovanie	Hodnotenie
Žiadny erytém	0
Veľmi slabý erytém (sotva pozorovateľný)	1
Jasne ohraničený erytém	2
Mierny až silný erytém	3
Výrazný erytém (tmavočervený) až vytvorenie chrasty zabraňujúcej posúdeniu erytému	4

23. Okrem 25 % zvýšenia hrúbky ucha (26) (27) sa štatisticky významné zvýšenie hrúbky ucha v testovanej skupine myší v porovnaní s kontrolnou skupinou myší použilo aj na identifikáciu dráždivých látok v LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Štatisticky významné zvýšenie hrúbky ucha môže nastať aj vtedy, keď dôjde k menšiemu zvýšeniu ako 25 %, nespája sa však konkrétne s nadmerným podráždením kože (30) (32) (33) (34).

24. Nasledujúce klinické pozorovania môžu indikovať systémovú toxicitu (35) (36), ak sú súčasťou integrovaného posudzovania, to znamená, že môžu indikovať maximálnu úroveň dávky na použitie v hlavnej štúdii LLNA: zmeny funkcie nervového systému (napr. piloerekcia, ataxia, triaška a kŕče); zmeny správania (napr. agresia, zmena pri čistení, výrazná zmena stupňa aktivity); zmena dýchania (t. j. zmena frekvencie alebo intenzity dýchania, ako napríklad zadúšanie, dýchavičnosť a šelest) a zmeny spotreby potravy a vody. Okrem toho treba v hodnotení zvážiť príznaky letargie a/alebo apatie a akékoľvek klinické príznaky silnejšej alebo dlhodobejšej bolesti a utrpenia alebo viac ako 5 % zníženie telesnej hmotnosti medzi dňom 1 a 6 a úmrtnosť. Umierajúce zvieratá alebo zvieratá, ktoré majú očividne silné bolesti alebo vykazujú pretrvávajúce príznaky silného utrpenia, by sa mali humánnym spôsobom usmrtiť (37).

▼M3

Harmonogram pokusov v hlavnej štúdii

25. Harmonogram pokusov v rámci skúšky je takýto:

— Deň 1: Označte každé zviera a zaznamenajte jeho hmotnosť a akékoľvek klinické pozorovania. Začnite s aplikáciou 25 µl z príslušného zriedenia testovanej látky, samotného nosiča alebo pozitívnej kontroly (súbežnej alebo súčasnej, podľa laboratórnych pravidiel s prihliadnutím na odseky 11 – 15) na zadnú stranu každého ucha.

— Dni 2 a 3: Zopakujte aplikačný postup uskutočnený v deň 1.

— Dni 4 a 5: Žiadne ošetrenie.

— Deň 6: Zaznamenajte hmotnosť každého zvieraťa. Injekčne podajte všetkým pokusným a kontrolným myšiam 250 µl sterilného fosfátom tlmeného fyziologického roztoku (PBS) obsahujúceho 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) ^{3}H-metyltymidínu cez chvostovú žilu. Alternatívne injekčne podajte všetkým myšiam 250 µl sterilného PBS obsahujúceho 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I-jódodeoxyuridínu a 10^{-5}M-fluorodeoxyuridínu cez chvostovú žilu. O päť hodín sa zvieratá humánne usmrtia. Drénované ušné lymfatické uzliny sa odstránia z každého ucha myši a spracujú sa spoločne v PBS pre každé zviera (metóda jednotlivých zvierat) alebo sa lymfatické uzliny odstránia z každého ucha a spoločne spracujú v PBS pre každú pokusnú skupinu (metóda spojených pokusných skupín). Údaje a diagramy identifikácie a disekcie lymfatických uzlín možno nájsť v odkaze (12). Pri ďalšom monitorovaní lokálnej odozvy kože v hlavnej štúdii možno do protokolu štúdie zahrnúť ďalšie parametre, ako napríklad hodnotenie erytému ucha alebo merania hrúbky ucha (získané pomocou meradla hrúbky alebo vážením vzoriek uší pri pitve).

Príprava bunkových suspenzií

26. Jednobunková suspenzia buniek lymfatických uzlín (LNC), odobraná bilaterálne s použitím metódy jednotlivých zvierat alebo alternatívnej metódy spojenej pokusnej skupiny, sa pripravuje jemným mechanickým pretlačením cez sitko z nerezovej ocele so šírkou oka 200 µm alebo inou prijateľnou technikou na prípravu jednobunkovej suspenzie. Bunky lymfatických uzlín sa dvakrát premyjú v prebytku PBS a DNA sa vyzráža 5 % kyselinou trichlóroctovou (TCA) pri 4 °C počas 18 hod. (3). Pelety sa buď opätovne suspendujú v 1 ml TCA a prenesú do scintilačných fľaštičiek obsahujúcich 10 ml scintilačnej kvapaliny na čítanie ^{3}H, alebo sa prenesú priamo do gammačítacích túb na čítanie ^{125}I.

Stanovenie proliferácie buniek (naviazaná rádioaktivita)

27. Začlenenie ^{3}H-metyltymidínu sa meria β-scintilačným čítaním ako dezintegrácia za minútu (DPM). Začlenenie ^{125}I-jododeoxyuridínu sa meria čítaním ^{125}I a tiež sa vyjadruje ako dezintegrácia za minútu (DPM). V závislosti od použitej metódy sa začlenenie vyjadrí ako DPM/myš (metóda jednotlivých zvierat) alebo DPM/pokusná skupina (metóda spojenej pokusnej skupiny).

Redukovaná LLNA

28. V určitých situáciách, keď vznikne regulačná potreba potvrdiť negatívny predpoklad potenciálu senzibilizácie kože, možno použiť voliteľný protokol rLLNA (16) (17) (18) s použitím menšieho počtu zvierat, ak existuje súlad so všetkými ostatnými špecifikáciami protokolov LLNA v tejto testovacej metóde. Pred použitím metódy rLLNA je potrebné poskytnúť jasné a vedecké odôvodnenia použitia tejto metódy. Ak sa dosiahne pozitívny alebo nejasný výsledok, možno bude potrebné vykonať ďalšie testovanie, aby bola možná interpretácia alebo objasnenie zistenia.

▼M3

29. Zníženie počtu dávkových skupín je jediný rozdiel medzi protokolmi testovacích metód LLNA a rLLNA a z tohto dôvodu rLLNA neposkytuje informácie o odozve na dávku. Preto by sa rLLNA nemala používať v prípadoch, keď sú potrebné informácie o odozve na dávku. Podobne ako pri viacdávkovej LLNA by koncentrácia testovanej látky hodnotenej v rLLNA mala byť maximálnou koncentráciou, ktorá nespôsobuje zjavnú systémovú toxicitu a/ani nadmerné lokálne podráždenie kože myši (pozri odsek 18).

POZOROVANIA

Klinické pozorovania

30. Každá myš sa starostlivo vyšetrí aspoň jedenkrát denne na všetky klinické príznaky, či už ide o lokálne podráždenie v mieste aplikácie, alebo systémovú toxicitu. Všetky pozorovania sa systematicky zaznamenávajú, pričom každá myš má individuálny záznam. Plány na monitorovanie by mali zahŕňať kritériá na rýchlu identifikáciu tých myší, ktoré vykazujú systémovú toxicitu, nadmerné lokálne podráždenie alebo poleptanie kože a ktoré majú byť humánne usmrtené (37).

Telesné hmotnosti

31. Ako sa uvádza v odseku 25, telesné hmotnosti jednotlivých zvierat by sa mali odmerať na začiatku testu a pri naplánovanom usmrtení zvierat.

VÝPOČET VÝSLEDKOV

32. Výsledky sa vyjadrujú ako stimulačný index (SI). Pri použití metódy jednotlivých zvierat sa SI získa vydelením priemernej hodnoty DPM/myš v rámci každej skupiny, ktorej sa podávala testovaná látka, a pozitívnej kontrolnej skupiny priemernou hodnotou DPM/myš kontrolnej skupiny, ktorej sa podávalo rozpúšťadlo/nosič. Priemerná hodnota SI kontrolných skupín, ktorým sa podával nosič, je potom 1. Pri použití metódy spojenej pokusnej skupiny sa SI získa vydelením hodnoty spojeného rádioaktívneho začlenenia v každej pokusnej skupine hodnotou začlenenia v spojenej kontrolnej skupine s nosičom; a tým sa získa priemerná hodnota SI.

33. V rozhodovacom procese sa za pozitívny výsledok považuje stimulačný index ≥ 3. Pri určovaní toho, či je hraničný výsledok pozitívny, sa však môže použiť aj sila odozvy na dávku, štatistický význam a konzistentnosť odoziev na rozpúšťadlo/nosič a odoziev na pozitívnu kontrolu (4), (5), (6).

34. Ak je potrebné vysvetliť získané výsledky, pozornosť by sa mala venovať rôznym vlastnostiam testovanej látky vrátane toho, či má štrukturálny vzťah k látkam, ktoré sú známymi senzibilizátormi kože, či spôsobuje nadmerné lokálne podráždenie kože, a charakteru pozorovanej odozvy na dávku. Tieto a ostatné hľadiská sa podrobne rozoberajú inde (7).

35. Zbieranie údajov o rádioaktivite na úrovni jednotlivých myší umožní vykonať štatistickú analýzu prítomnosti a úrovne vzťahu medzi dávkou a odozvou. Každé štatistické posúdenie by mohlo zahŕňať hodnotenie vzťahu medzi dávkou a odozvou, ako aj vhodne upravené porovnávania pokusných skupín (napr. porovnávania v pároch skupiny, ktorej sa podáva dávka, a súbežnej kontrolnej skupiny s nosičom). Štatistické analýzy môžu zahŕňať napr. lineárnu regresiu alebo Williamsov test na posúdenie trendov vo vzťahu medzi dávkou a odozvou a Dunnettov test na porovnávanie v pároch. Pri výbere vhodnej metódy štatistickej analýzy by si výskumný pracovník mal uvedomovať možné nerovnosti rozdielov a ďalšie súvisiace problémy, ktoré si môžu vyžadovať premenu údajov alebo štatistickú analýzu založenú na iných ako parametrických údajoch. Výskumný pracovník bude možno v každom prípade musieť vykonať výpočty SI a štatistické analýzy s určitými dátovými bodmi a bez nich (niekedy sa tieto údaje nazývajú „extrémne hodnoty“).

▼M3

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

36. Údaje by sa mali uvádzať v tabuľkovej podobe. Pri použití metódy jednotlivých zvierat sa v tabuľke uvedú hodnoty DPM u jednotlivých zvierat, skupinová priemerná hodnota DPM/zviera, súvisiaci rozsah chyby (napr. SD, SEM) a priemerná hodnota SI každej dávkovej skupiny v porovnaní so súbežnou kontrolnou skupinou s nosičom. Pri použití metódy spojenej pokusnej skupiny sa v tabuľke uvedie priemerná/prostredná hodnota DPM a priemerná hodnota SI každej dávkovej skupiny v porovnaní so súbežnou kontrolnou skupinou s nosičom.

Správa o teste

37. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testované a kontrolné látky:

— identifikačné údaje (napr. čísla CAS, čísla EC, ak sú k dispozícii, zdroj, čistota; známe nečistoty, číslo šarže),

— fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti (napr. prchavosť, stabilita, rozpustnosť),

— v prípade zmesi zloženie a relatívny percentuálny podiel zložiek.

Rozpúšťadlo/nosič:

— identifikačné údaje (čistota, v prípade potreby koncentrácia, použitý objem),

— zdôvodnenie voľby nosiča.

Testovacie zvieratá:

— použitý kmeň myší CBA,

— mikrobiologický stav zvierat, ak je známy,

— počet a vek zvierat,

— zdroj zvierat, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

Podmienky testu:

— informácie o príprave a aplikácii testovanej látky,

— zdôvodnenie výberu dávky (vrátane výsledkov z predbežného skríningového testu, ak sa uskutočnil),

— použité koncentrácie nosiča a testovanej látky a celkové množstvo aplikovanej testovanej látky,

— údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu/zdroja krmiva, zdroja vody),

— podrobný opis harmonogramu podávania dávok a odberu vzoriek,

— metódy merania toxicity,

— kritériá na hodnotenie štúdií ako pozitívnych alebo negatívnych,

— informácie o akýchkoľvek odchýlkach od protokolu a vysvetlenie, ako odchýlky ovplyvňujú návrh a výsledky štúdie.

Kontrola spoľahlivosti:

— súhrn výsledkov poslednej kontroly spoľahlivosti vrátane informácií o testovanej látke, koncentrácii a použitom nosiči,

— údaje o súbežnej a/alebo historickej pozitívnej kontrole a súbežnej negatívnej kontrole testovacieho laboratória,

▼M3

— ak nebola zahrnutá súbežná pozitívna kontrola, dátum a laboratórna správa o najaktuálnejšej periodickej pozitívnej kontrole a správa s historickými údajmi o pozitívnej kontrole, ktorými laboratórium zdôvodňuje nevykonanie súbežnej pozitívnej kontroly.

Výsledky:

— hmotnosti jednotlivých myší na začiatku podávania dávky a pri naplánovanom usmrtení, ako aj priemerný a súvisiaci rozsah chyby (napr. SD a SEM) pre každú pokusnú skupinu,

— časový priebeh nástupu príznakov toxicity u každého zvieraťa vrátane podráždenia kože na mieste podania látky, ak sa vyskytnú,

— tabuľka hodnôt DPM a SI u jednotlivých myší (metóda jednotlivých zvierat) alebo priemerných/prostredných hodnôt DPM a SI (metóda spojenej pokusnej skupiny) v každej pokusnej skupine,

— priemerný a súvisiaci rozsah chyby (napr. SD, SEM) v súvislosti s hodnotou DPM/myš v každej pokusnej skupine a výsledky analýzy extrémnej hodnoty v každej pokusnej skupine pri použití metódy jednotlivých zvierat,

— výpočet SI a vhodná miera variability, ktorá berie do úvahy variabilitu medzi zvieratami v skupinách, ktorým sa podáva testovaná látka, a v kontrolných skupinách pri použití metódy jednotlivých zvierat,

— vzťah medzi dávkou a odozvou,

— v prípade potreby štatistické analýzy.

Rozbor výsledkov:

— stručný komentár v súvislosti s výsledkami, analýza odozvy na dávku, štatistické analýzy, ak existujú, s uvedením záveru, či by sa testovaná látka mala považovať za látku spôsobujúcu senzibilizáciu kože.

LITERATÚRA

1. OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. K dispozícii na stránke: [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. Healt.*, 53, 563 – 579.

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 – 333.

▼**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. Pharmaco.*, 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. Pharmaco.*, 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. Pharmaco.*, 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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llna-rep.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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: 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. K dispozícii na stránke: [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 Toxicit.*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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 Evaluatio.*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼M3

Dodatok 1

Normy výkonnosti na posudzovanie navrhovaných podobných alebo upravených testovacích metód LLNA na senzibilizáciu kože

ÚVOD

1. Cieľom noriem výkonnosti (PS) je oznámiť základ, na ktorom možno určiť, že nové testovacie metódy, či už chránené (t. j. chránené autorským právom, obchodnou značkou, registrované), alebo nechránené, sú dostatočne presné a spoľahlivé na konkrétne účely testovania. Tieto normy výkonnosti sú založené na validovaných a akceptovaných testovacích metódach a možno ich použiť na hodnotenie spoľahlivosti a presnosti ďalších podobných metód (hovorovo nazývaných testy „me-too“), ktoré sú založené na podobných vedeckých zásadách a merajú alebo prognózujú rovnaký biologický alebo toxický účinok (14).

2. Pred prijatím upravených metód (t. j. navrhnutých potenciálnych zlepšení schválenej testovacej metódy) je potrebné vykonať hodnotenie s cieľom určiť účinok navrhnutých zmien na výkonnosť testu a rozsah, v akom takéto zmeny ovplyvňujú informácie dostupné pre ďalšie zložky procesu validácie. V závislosti od počtu a povahy navrhovaných zmien, získaných údajov a sprievodnej dokumentácie k týmto zmenám by sa na ne mal vzťahovať buď rovnaký proces validácie, akým prechádza nový test, alebo prípadne obmedzené posúdenie spoľahlivosti a relevantnosti na základe zavedených noriem výkonnosti (14).

3. Podobné alebo upravené metódy navrhnuté na použitie v tejto testovacej metóde by sa mali posúdiť s cieľom určiť ich spoľahlivosť a presnosť pri použití chemikálií, ktoré zastupujú celý rozsah hodnotení LLNA. S cieľom zabrániť neoprávnenému použitiu zvierat sa dôrazne odporúča, aby tvorcovia modelov konzultovali s príslušnými orgánmi pred začatím validačných štúdií v súlade s normami výkonnosti a usmernením uvedeným v tejto testovacej metóde.

4. Tieto normy výkonnosti sú založené na zosúladených normách výkonnosti amerického medziagentúrneho koordinačného výboru pre validáciu alternatívnych metód (US-ICCVAM), Európskeho centra pre validáciu alternatívnych metód (ES-ECVAM) a japonského centra pre validáciu alternatívnych metód (JaCVAM) (12), na základe ktorých sa hodnotí platnosť podobných alebo upravených verzií LLNA. Do noriem výkonnosti patria nevyhnutné zložky testovacej metódy, odporúčané referenčné chemikálie a normy presnosti a spoľahlivosti, ktoré by navrhnutá metóda mala dosiahnuť alebo presiahnuť.

I. **Nevyhnutné zložky testovacej metódy**

5. S cieľom zabezpečiť, že podobná alebo upravená metóda LLNA bude z funkčného a mechanického hľadiska podobná metóde LLNA a bude merať rovnaký biologický účinok, do protokolu testovacej metódy by sa mali zahrnúť tieto zložky:

— Testovacia látka by sa mala lokálne aplikovať na obe uši myši.

— Proliferácia lymfocytov by sa mala merať v lymfatickej uzline v drénovanom mieste aplikácie testovanej látky.

— Proliferácia lymfocytov by sa mala merať počas indukčnej fázy senzibilizácie kože.

▼M3

— Zvolená najvyššia dávka testovanej látky by mala obsahovať maximálnu koncentráciu látky, ktorá nespôsobuje systémovú toxicitu a/ani nadmerné lokálne podráždenie kože myši. Najvyššia dávka pozitívnych referenčných chemikálií by mala byť prinajmenšom taká vysoká ako hodnoty LLNA EC3 zodpovedajúcich referenčných chemikálií (pozri tabuľku 1), ktoré nespôsobujú systémovú toxicitu a/ani nadmerné lokálne podráždenie kože myši.

— Každá štúdia by mala obsahovať súbežnú kontrolnú skupinu, ktorej sa podáva nosič, a v prípade potreby by sa mala použiť aj súbežná pozitívna kontrola.

— V skupine, ktorej sa podáva dávka, by mali byť minimálne štyri zvieratá.

— Možno zbierať údaje o jednotlivých zvieratách alebo spojené údaje o zvieratách.

Ak nebude splnené niektoré z týchto kritérií, potom tieto normy výkonnosti nemožno použiť na validáciu podobnej alebo upravenej metódy.

II. **Minimálny zoznam referenčných látok**

6. Zosúladené normy výkonnosti US-ICCVAM, ES-ECVAM a japonského JaCVAM (12) identifikovali 18 minimálnych referenčných chemikálií, ktoré by sa mali použiť, a štyri nepovinné referenčné chemikálie [t. j. látky, s ktorými sa v LLNA dosiahli falošné pozitívne alebo falošné negatívne výsledky v porovnaní s výsledkami, ktoré sa dosiahli u ľudí a morčiat (B.6 alebo usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13), a preto poskytujú príležitosť na dosiahnutie rovnakej alebo lepšej výkonnosti ako LLNA], ktoré sú zahrnuté do noriem výkonnosti LLN. Kritériá výberu na identifikáciu týchto chemikálií boli:

— zoznam referenčných chemikálií zastupujúcich druhy látok, ktoré sa zvyčajne testujú v súvislosti s ich potenciálom spôsobiť senzibilizáciu kože, a rozsah odoziev, ktoré LLNA dokáže merať alebo prognózovať,

— látky mali dobre vymedzené chemické štruktúry,

— pre každú látku boli dostupné údaje z LLNA testov na morčatách (t. j. B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13) a (ak existujú) údaje z testov na ľuďoch a

— látky boli ľahko dostupné z komerčného zdroja.

Odporúčané referenčné chemikálie sú uvedené v tabuľke 1. Štúdie, v ktorých sa používajú navrhnuté referenčné chemikálie, by sa mali hodnotiť v nosiči, s ktorým sú uvedené v tabuľke 1. V situáciách, keď uvedená látka nie je dostupná, môžu sa použiť iné látky, ktoré spĺňajú uvedené kritériá výberu, a tento výber sa musí dostatočne zdôvodniť.

▼M3

Tabuľka 1

Odporúčané referenčné chemikálie pre normy výkonnosti LLNA

Číslo	Chemikálie ([1])	Číslo CAS	Forma	Nosič ([2])	EC3 % ([3])	P ([4])	0,5x – 2,0x EC3	Skutočný rozsah EC3	LLNA/morča	LLNA/človek
1.	5-chlór-2-metyl-4-izotiazolín-3-ón (CMI)/2-metyl-4-izotiazolín-3-ón (MI) ([5])	26172-55-4/ 2682-20-4	kvap.	DMF	0,009	1	0,0045 – 0,018	NC	+/+	+/+
2.	DNCB	97-00-7	tuhá	AOO	0,049	15	0,025 – 0,099	0,02 – 0,094	+/+	+/+
3.	4-fenyléndiamín	106-50-3	tuhá	AOO	0,11	6	0,055 – 0,22	0,07 –0,16	+/+	+/+
4.	chlorid kobaltnatý	7646-79-9	tuhá	DMSO	0,6	2	0,3 –1,2	0,4 – 0,8	+/+	+/+
5.	izoeugenol	97-54-1	kvap.	AOO	1,5	47	0,77 – 3,1	0,5 – 3,3	+/+	+/+
6.	2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	tuhá	DMF	1,7	1	0,85 – 3,4	NC	+/+	+/+
7.	citral	5392-40-5	kvap.	AOO	9,2	6	4,6 – 18,3	5,1 – 13	+/+	+/+
8.	HCA	101-86-0	kvap.	AOO	9,7	21	4,8 – 19,5	4,4 – 14,7	+/+	+/+
9.	eugenol	97-53-0	kvap.	AOO	10,1	11	5,05 – 20,2	4,9 – 15	+/+	+/+
10.	fenyl-benzoát	93-99-2	tuhá	AOO	13,6	3	6,8 – 27,2	1,2 – 20	+/+	+/+
11.	škoricový alkohol	104-54-1	tuhá	AOO	21	1	10,5 – 42	NC	+/+	+/+
12.	imidazolidinyl močovina	39236-46-9	tuhá	DMF	24	1	12 – 48	NC	+/+	+/+
13.	metyl-metakrylát	80-62-6	kvap.	AOO	90	1	45 – 100	NC	+/+	+/+
14.	chlórbenzén	108-90-7	kvap.	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15.	izopropanol	67-63-0	kvap.	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

Číslo	Chemikálie (1)	Číslo CAS	Forma	Nosič (2)	EC3 % (3)	P (4)	0,5x – 2,0x EC3	Skutočný rozsah EC3	LLNA/morča	LLNA/človek
16.	kyselina mliečna	50-21-5	kvap.	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17.	metyl salicylát	119-36-8	kvap.	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18.	kyselina salicylová	69-72-7	tuhá	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Nepovinné látky na preukázanie lepšej výkonnosti vo vzťahu k LLNA										
19.	laurylsulfát sodný	151-21-3	tuhá	DMF	8,1	5	4,05 – 16,2	1,5 – 17,1	+/–	+/–
20.	etylénglykol dimetakrylát	97-90-5	kvap.	MEK	28	1	14 – 56	NC	+/–	+/+
21.	xylén	1330-20-7	kvap.	AOO	95,8	1	47,9 – 100	NC	+/ (**)	+/–
22.	chlorid nikelnatý	7718-54-9	tuhá	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Skratky: AOO = acetón: olivový olej (4: 1, objemové percentá); číslo CAS = Chemical Abstracts Service Number; DMF = *N,N*-dimetylformamid; DMSO = dimetylsulfoxid; DNCB = 2,4-dinitrochlórbenzén; EC3 = odhadovaná koncentrácia, ktorá je potrebná na dosiahnutie stimulačného indexu 3; morča = výsledok testu s morčaťom (t. j. B.6 alebo usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13); HCA = 3-fenyl-2-hexylpropanál; kvap. = kvapalná forma; LLNA = výsledok lokálnej skúšky lymfatických uzlín myší (t. j. B.42 alebo usmernenie OECD na vykonávanie testov 429) (1); MEK = metyletyl keton; NA = neuplatňuje sa, pretože stimulačný index je nižší ako 3; NC = nie je vypočítaný, pretože údaje boli získané z jedinej štúdie; tuhá = tuhá forma látky; nosič = testovaný nosič.

(*) Považuje sa za látku, ktorá nespôsobuje senzibilizáciu kože u ľudí vzhľadom na skutočnosť, že v klinických náplasťových testoch neboli zistené žiadne výsledky, látka nie je súčasťou náplasťových testov ako jeden z alergénov a neboli zistené žiadne prípady senzibilizácie u ľudí.

(**) Údaje z testov s morčatami nie sú dostupné.

(1) Chemikálie by sa mali pripravovať každý deň okrem prípadu, keď údaje o stabilite preukazujú prijateľnosť uskladnenia.

(2) Vzhľadom na pravdepodobný vplyv rôznych nosičov na výkonnosť LLNA by sa mal pre každú referenčnú chemikáliu použiť odporúčaný nosič (24) (32).

(3) Priemerná hodnota sa používa v prípade, že je k dispozícii viac ako jedna hodnota EC3. Pri negatívnych látkach (t. j. so stimulačným indexom < 3) sa vyjadruje najvyššia testovaná koncentrácia.

(4) Počet štúdií LLNA, z ktorých boli získané údaje.

(5) Komerčne dostupné ako Kathon CG (číslo CAS 55965-84-9), čo je zmes CMI a MI v pomere 3: 1. Relatívne koncentrácie každej zložky sa pohybujú v rozmedzí od 1,1 % do 1,25 % (CMI) a od 0,3 % do 0,45 % (MI). Neaktívne zložky sú magnéziové soli (21,5 % až 24 %) a dusičnan meďnatý (0,15 % až 0,17 %), pričom zvyšok tvorí 74 % až 77 % vody. Kathon CG je k dispozícii prostredníctvom spoločnosti Sigma-Aldrich a Rohm and Haas (teraz sa spoločnosť nazýva Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Vymedzené normy spoľahlivosti a presnosti**

7. Presnosť podobnej alebo upravenej metódy LLNA by mala splniť alebo presiahnuť výkonnostnú normu LLNA, ak sa posudzuje s použitím minimálne 18 referenčných chemikálií, ktoré sa majú použiť. Nová alebo upravená metóda by mala viesť k správnej klasifikácii založenej na rozhodovaní typu „áno/nie“. Nová alebo upravená metóda však nemusí správne klasifikovať všetky minimálne referenčné chemikálie, ktoré sa majú použiť. Ak bol napríklad jeden zo slabých senzibilizátorov nesprávne klasifikovaný, na preukázanie rovnakej výkonnosti by sa mohla zvážiť možnosť zdôvodniť túto nesprávnu klasifikáciu a poskytnúť ďalšie primerané údaje (napr. výsledky testov, ktoré správne klasifikujú ostatné látky s podobnými fyzikálnymi, chemickými a senzibilizačnými vlastnosťami, aké majú tie látky, ktoré boli nesprávne klasifikované). Za týchto okolností by sa stav validácie novej alebo upravenej testovacej metódy LLNA posudzoval od prípadu k prípadu.

Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť

8. Na určenie vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti by sa nová alebo upravená metóda LLNA mala posudzovať s použitím senzibilizujúcej látky, ktorá je v LLNA dobre charakterizovaná. Preto sú normy výkonnosti LLNA založené na variabilite výsledkov z opakovaných testov s 3-fenyl-2-hexylpropanálom (HCA). Na posúdenie vnútrolaboratórnej spoľahlivosti by sa prahové hodnoty odhadovanej koncentrácie (ECt) HCA mali určiť pri štyroch osobitných príležitostiach, pričom medzi jednotlivými testami je časový rozdiel aspoň jeden týždeň. Prijateľnú vnútrolaboratórnu reprodukovateľnosť indikuje schopnosť laboratória získať v každom teste s HCA hodnoty ECt medzi 5 % a 20 %, čo predstavuje rozsah 0,5 – 2,0-násobku priemernej hodnoty EC3 definovanej pre HCA (10 %) v LLNA (pozri tabuľku 1).

Medzilaboratórna reprodukovateľnosť

9. Medzilaboratórna reprodukovateľnosť novej alebo upravenej metódy LLNA by sa mala posudzovať s použitím dvoch senzibilizujúcich látok, ktoré sú v LLNA dobre charakterizované. Normy výkonnosti LLNA sú založené na variabilite výsledkov testov s HCA a 2,4-dinitrochlórbenzénom (DNCB) v rôznych laboratóriách. Hodnoty ECt by sa mali určiť nezávisle z jednej štúdie vykonanej minimálne v troch rôznych laboratóriách. Na preukázanie prijateľnej medzilaboratórnej reprodukovateľnosti by každé laboratórium malo získať hodnoty ECt medzi 5 % a 20 % pri HCA a 0,025 % až 0,1 % pri DNCB, čo predstavuje rozsah 0,5 – 2,0-násobku priemerných koncentrácií EC3 definovaných pre HCA (10 %) a DNCB (0,05 %) v LLNA (pozri tabuľku 1).

▼M3

Dodatok 2

Vymedzenie pojmov

Presnosť: Miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o opatrenie výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa ako synonymum s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (14).

Referenčná látka: Látka spôsobujúca alebo nespôsobujúca senzibilizáciu, ktorá sa používa ako štandardná látka na porovnávanie s testovanou látkou. Referenčná látka by mala mať tieto vlastnosti: i) konzistentný(-é) a spoľahlivý(-é) zdroj(-e); ii) štrukturálnu a funkčnú podobnosť s triedou látok, ktoré sa budú testovať; iii) známe fyzikálno-chemické vlastnosti; iv) podporné údaje o známych účinkoch a v) známu potenciu v rozsahu želanej odozvy.

Prahová hodnota odhadovanej koncentrácie (ECt): Odhadovaná koncentrácia testovanej látky potrebná na dosiahnutie stimulačného indexu, ktorý naznačuje pozitívnu odozvu.

Odhadovaná koncentrácia tri (EC3): Odhadovaná koncentrácia testovanej látky potrebná na dosiahnutie stimulačného indexu 3.

Falošný negatívny výsledok: Testovaná látka je testovanou metódou nesprávne identifikovaná ako negatívna alebo neaktívna, pričom v skutočnosti je pozitívna alebo aktívna.

Falošný pozitívny výsledok: Testovaná látka je testom nesprávne identifikovaná ako pozitívna alebo aktívna, pričom v skutočnosti je negatívna alebo neaktívna.

Nebezpečnosť: Potenciál škodlivého účinku na zdravie alebo životné prostredie. Škodlivý účinok sa prejavuje až pri dostatočnej hladine expozície.

Medzilaboratórna reprodukovateľnosť: Miera, do akej rôzne kvalifikované laboratóriá, ktoré používajú rovnaký protokol a testujú rovnaké testovacie látky, dokážu dosiahnuť kvalitatívne a kvantitatívne podobné výsledky. Medzilaboratórna reprodukovateľnosť sa určuje počas postupov pred validáciou a v rámci postupov validácie a znamená mieru, do akej možno test úspešne prenášať medzi laboratóriami. Takisto je známa ako reprodukovateľnosť medzi laboratóriami (14).

Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť: Určenie miery, do akej kvalifikovaní pracovníci v rámci jedného laboratória dokážu úspešne opakovať výsledky s použitím konkrétneho protokolu v rôznom čase. Takisto je známa ako reprodukovateľnosť v rámci laboratória (14).

Test me-too: Hovorový názov testovacej metódy, ktorá je štrukturálne a funkčne podobná validovanej a akceptovanej referenčnej testovacej metóde. Takáto testovacia metóda by bola kandidátom na ďalšiu validáciu. Môže sa používať namiesto podobnej testovacej metódy (14).

Extrémna hodnota: Extrémna hodnota je pozorovanie, ktoré je značne odlišné od ostatných hodnôt v náhodnej vzorke z populácie.

Normy výkonnosti (PS): Normy založené na validovanej testovacej metóde, ktoré slúžia ako základ na hodnotenie porovnateľnosti navrhovanej testovacej metódy, ktorá je funkčne a mechanicky podobná. Patria sem: i) nevyhnutné zložky testovacej metódy; ii) minimálny zoznam referenčných chemikálií vybraných spomedzi látok používaných na preukázanie prijateľnej výkonnosti validovanej testovacej metódy a iii) porovnateľné úrovne presnosti a spoľahlivosti založené na tom, čo sa získalo pre validovanú testovaciu metódu a čo by navrhovaná testovacia metóda mala preukázať pri hodnotení pomocou minimálneho zoznamu referenčných chemikálií (14).

Chránená testovacia metóda: Testovacia metóda, ktorej výrobu a distribúciu obmedzujú patenty, autorské práva, obchodné značky atď.

▼**M3**

Zabezpečovanie kvality: Riadiaci proces, v ktorom jednotlivci nezávislí od osôb vykonávajúcich testy posudzujú súlad s laboratórnymi testovacími normami, požiadavkami a postupmi vedenia záznamov, ako aj presnosť prenosu údajov.

Referenčné chemikálie: Chemikálie vybrané na použitie v procese validácie, pre ktoré už sú známe odozvy v referenčnom testovacom systéme *in vitro* alebo *in vivo* alebo odozvy u daných druhov zvierat. Tieto chemikálie by mali byť zástupcami tried chemikálií, v súvislosti s ktorými sa očakáva použitie testovacej metódy, a mali by zastupovať celý rozsah odoziev od silných po slabé alebo negatívne odozvy, ktoré možno očakávať od chemikálií, pri ktorých sa môže metóda použiť. Rôzne skupiny referenčných chemikálií sa môžu vyžadovať v rôznych štádiách procesu validácie a pre rôzne testovacie metódy a použitia testov (14).

Relevantnosť: Opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej test správne meria alebo prognózuje biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testovacej metódy (14).

Spoľahlivosť: Meria rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia opakovane vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti (14).

Senzibilizácia kože: Imunologický proces, ku ktorému dochádza po lokálnom vystavení náchylného jednotlivca chemickému alergénu, ktorý vyvoláva kožnú imunitnú odozvu, ktorá môže viesť k vytvoreniu kontaktnej senzibilizácie.

Stimulačný index (SI): Hodnota vypočítaná na posúdenie potenciálu testovanej látky spôsobiť senzibilizáciu kože; ide teda o pomer proliferácie v pokusných skupinách a proliferácie v súbežných kontrolných skupinách, ktorým sa podáva nosič.

Testovaná látka (tiež sa nazýva testovaná chemikália): Akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Validovaná testovacia metóda: Testovacia metóda, v súvislosti s ktorou sa ukončili validačné štúdie na stanovenie relevantnosti (vrátane presnosti) a spoľahlivosti na konkrétny účel. Je dôležité poznamenať, že validovaná testovacia metóda nemusí mať dostatočnú výkonnosť, pokiaľ ide o presnosť a spoľahlivosť, aby bola prijateľná pre navrhovaný účel (14).

▼B

B.43. ŠTÚDIA NEUROTOXICITY U HLODAVCOV

1. METÓDA

Táto metóda je rovnocenná s OECD TG 424 (1997).

Táto testovacia metóda bola vyvinutá na získanie informácií, ktoré sú potrebné na potvrdenie potenciálnej neurotoxicity chemikálií u dospelých zvierat alebo jej ďalšiu charakterizáciu. Môže sa buď kombinovať s existujúcimi testovacími metódami pre štúdie toxicity pri opakovanej dávke, alebo sa môže vykonať ako samostatná štúdia. Pri plánovaní štúdií, ktoré sú založené na tejto testovacej metóde, sa odporúča, aby sa na pomoc nahliadlo do OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods (1). Toto je dôležité najmä, keď sa zvažujú modifikácie vyšetrení a testovacích postupov odporúčaných pre bežné používanie tejto metódy. The Guidance Document bol pripravený, aby uľahčil výber iných testovacích postupov na použitie za špecifických podmienok.

Posúdenie vývojovej neurotoxicity nie je predmetom tejto metódy.

1.1. ÚVOD

Pri posudzovaní a hodnotení toxických vlastností chemikálií je dôležité posúdiť potenciál vyvolať neurotoxické účinky. Práve testovacia metóda pre systémovú toxicitu pri opakovanej dávke zahrnuje vyšetrenia, ktoré skúmajú potenciálnu neurotoxicitu. Táto testovacia metóda sa môže použiť na zostavenie štúdie, ktorou sa získajú alebo potvrdia ďalšie informácie o neurotoxických účinkoch v štúdiách systémovej toxicity pri opakovanej dávke. Posúdenie potenciálnej neurotoxicity určitých tried chemikálií by však mohlo viesť k tomu, že sa môžu lepšie posudzovať s použitím tejto metódy bez predchádzajúcej indikácie potenciálnej neurotoxicity zo štúdií systémovej toxicity pri opakovanej dávke. Takéto posudzovanie zahrnuje napríklad:

— pozorovanie neurologických príznakov alebo neuropatologických lézií v iných štúdiách toxicity ako sú štúdie systémovej toxicity pri opakovanej dávke, alebo

— štrukturálnu príbuznosť alebo iné informácie, ktoré ich spájajú so známymi neurotoxikantami.

Okrem toho sa môžu vyskytnúť aj iné príklady, keď je vhodné použitie tejto testovacej metódy; ďalšie informácie pozri v odkaze (1).

Táto metóda bola vyvinutá tak, aby sa dala prispôsobiť osobitným potrebám na potvrdenie špecifickej histopatologickej a behaviorálnej neurotoxicity chemikálie, ako aj na umožnenie charakterizácie a kvantifikácie neurotoxických reakcií. V minulosti sa neurotoxicita stotožňovala s neuropatiou, ktorá zahrnuje neuropatologické lézie alebo neurologické dysfunkcie, ako sú záchvat, paralýza alebo triaška.

▼B

Aj keď neuropatia je dôležitým prejavom neurotoxicity, teraz je zrejmé, že existuje mnoho ďalších príznakov nervovej systémovej toxicity (napr. strata motorickej koordinácie, senzorické deficity, dysfunkcie týkajúce sa schopnosti sa učiť a pamäte), ktoré sa nemôžu prejaviť v štúdiách neuropatie alebo iných typoch štúdií.

Táto testovacia metóda na dôkaz neurotoxicity je vyvinutá na stanovenie hlavných neurobehaviorálnych a neuropatologických účinkov u dospelých hlodavcov. Hoci účinky na správanie, aj keď pri neprítomnosti morfologických zmien, môžu odrážať nepriaznivý vplyv na organizmus, nie všetky zmeny v správania sú špecifické pre nervový systém. Preto je potrebné všetky pozorované zmeny hodnotiť v súvislosti s korelačnými histopatologickými, hematologickými alebo biochemickými údajmi, ako aj údajmi o iných typoch systémovej toxicity. Testovanie uvádzané v tejto metóde na umožnenie charakterizácie a kvantifikácie neurotoxických reakcií zahrnuje špecifické histopatologické a behaviorálne postupy, ktoré sa môžu ďalej opierať o elektrofyziologické a/alebo biochemické vyšetrenia (1), (2), (3), (4).

Neurotoxikanty môžu pôsobiť na množstvo cieľov v nervovom systéme a rozličnými mechanizmami. Keďže žiadny samostatný súbor testov nie je schopný dôkladne posúdiť neurotoxický potenciál všetkých látok, môže byť potrebné využiť iné *in vivo* alebo *in vitro* testy, ktoré sú špecifické pre zistený alebo predpokladaný typ neurotoxicity.

Táto testovacia metóda sa môže tiež použiť v spojení s usmernením uvedeným v OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods (1) na zostavenie štúdií určených na ďalšiu charakterizáciu alebo zvýšenie citlivosti kvantifikácie reakcie na dávku, na lepšie stanovenie hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku alebo na dokázanie známych alebo podozrivých rizík chemikálie. Napríklad sa môžu zostaviť štúdie na identifikáciu a posúdenie neurotoxického(-ých) mechanizmu(-ov) alebo na doplnenie údajov, ktoré sú už k dispozícii z použitých základných neurobehaviorálnych a neuropatologických vyšetrovacích postupov. Takéto štúdie nevyžadujú opakované údaje, ktoré by sa získali na základe použitia štandardných postupov odporúčaných v tejto metóde, ak sú už takéto údaje k dispozícii a nepokladajú sa za potrebné pre interpretáciu výsledkov štúdie.

Táto štúdia neurotoxicity, použitá samostatne alebo v kombinácii, poskytuje informácie, ktoré môžu:

— identifikovať, či nervový systém je permanentne alebo reverzibilne ovplyvnený testovanou chemikáliou,

— prispieť ku charakterizácii zmien nervového systému spojených s vystavením sa pôsobeniu chemikálie a k pochopeniu príslušného mechanizmu,

▼B

— určiť vzťahy medzi dávkou a reakciou v závislosti od času na stanovenie hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku (ktorá sa môže použiť na stanovenie bezpečnostných kritérií pre chemikáliu).

Pri tejto metóde testovania sa testovaná látka podáva orálne. Iné cesty podávania (napr. dermálna alebo inhalačná) môžu byť vhodnejšie a môžu vyžadovať úpravu odporúčaných postupov. Rozhodnutie o tom akou cestou sa látka bude podávať závisí na profile expozície ľudí a na dostupných toxikologických alebo kinetických informáciách.

1.2. DEFINÍCIE

Nepriaznivý účinok: každá zmena v súvislosti s ošetrením od normálneho stavu, ktorá znižuje schopnosť organizmu prežiť, reprodukovať sa alebo prispôsobiť sa prostrediu.

Dávka: je množstvo podanej testovanej látky. Dávka sa vyjadruje ako hmotnosť (g, mg) alebo ako hmotnosť testovanej látky na jednotku hmotnosti testovaného zvieraťa (napr. mg/kg) alebo ako konštantné koncentrácie v krmive (ppm).

Dávkovanie: je všeobecný termín zahrnujúci podávanie látky, jej frekvenciu a trvanie podávania dávok.

Neurotoxicita: nepriaznivá zmena v štruktúre alebo funkcii nervového systému, ktorá vzniká v dôsledku vystavenia chemickému, biologickému alebo fyzikálnemu činiteľu.

Neurotoxikant: je každý chemický, biologický alebo fyzikálny činiteľ, ktorý môže spôsobiť neurotoxicitu.

NOAEL: je skratka pre hladinu bez pozorovaného nepriaznivého účinku a je to najvyššia dávka, pri ktorej sa nepozorujú žiadne nepriaznivé zistenia v súvislosti s ošetrením.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná chemikália sa podáva orálnou cestou v rade dávok niekoľkým skupinám laboratórnych hlodavcov. Zvyčajne sa vyžadujú opakované dávky a režim podávania dávok môže byť 28 dní, pre subchronickú (90 dní) alebo chronickú toxicitu (1 rok alebo viac). Postupy uvedené v tejto testovacej metóde sa môžu použiť aj pre štúdiu akútnej neurotoxicity. Zvieratá sa testujú na umožnenie detekcie alebo charakterizácie behaviorálnych a/alebo neurologických abnormalít. V priebehu každého obdobia pozorovania sa hodnotí rozsah behaviorálnych aspektov, ktoré by mohli byť ovplyvnené neurotoxikantami. Na konci testu sa časť zvierat každého pohlavia z každej skupiny pomocou perfúzie fixuje in situ a rezy tkaniva mozgu, miechy a periferálnych nervov sa pripravia a vyšetria.

Keď sa štúdia uskutočňuje ako samostatná štúdia na zistenie neurotoxicity alebo na charakterizáciu neurotoxických účinkov, zvieratá v každej skupine, ktoré sa nepoužili na perfúziu a následnú histopatológiu (pozri tabuľku 1), sa môžu použiť na špecifické neurobehaviorálne, neuropatologické, neurochemické alebo elektrofyziologické postupy, ktoré môžu doplniť údaje získané pri štandardných vyšetreniach vyžadovaných touto metódou (1). Tieto dodatočné postupy môžu byť osobitne užitočné, keď empirické pozorovania alebo očakávané účinky indikujú špecifický typ alebo cieľové tkanivo v prípade neurotoxicity spôsobenej chemikáliou. Alternatívne sa môžu zvyšné zvieratá použiť na také hodnotenie, ako sa vyžaduje v testovacích metódach pre štúdie toxicity pri opakovanej dávke u hlodavcov.

▼B

Ak sa postupy tejto testovacej metódy kombinujú s postupmi iných testovacích metód, je potrebný dostatočný počet zvierat na splnenie požiadaviek pre vyšetrenia v oboch štúdiách.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Výber druhu zvierat**

Spomedzi druhov hlodavcov sa prednostne používa potkan, aj keď je možné použiť aj iný druh hlodavca. Použijú sa mladé dospelé zdravé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Samice by mali byť panenské a negravidné. Dávkovanie by sa malo začať čo najskôr po odstavení, pokiaľ možno nie neskôr ako vo veku šesť týždňov, a v každom prípade pred dosiahnutím deviatich týždňov. Keď sa však táto štúdia kombinuje s inými štúdiami, môže byť potrebné túto vekovú požiadavku upraviť. Na začiatku štúdie rozdiel medzi hmotnosťami použitých zvierat nemá byť vyšší ako ± 20 % priemernej hmotnosti každého pohlavia. Keď sa uskutoční predbežná krátkodobá štúdia pri opakovaných dávkach pred uskutočnením dlhodobej štúdie, je potrebné v oboch štúdiách použiť zvieratá z rovnakého kmeňa a zdroja.

1.4.2. **Podmienky pre umiestnenie a kŕmenie**

Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C (± 3 °C). Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 %, a pokiaľ možno, nemala by prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti by mala dosahovať 50 – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé, v rytme 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Je potrebné obmedziť na minimum krátkodobý silný hluk. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú primes testovanej látky, keď sa podáva týmto spôsobom. Zvieratá môžu byť umiestnené jednotlivo alebo v malých skupinách rovnakého pohlavia v klietkach.

1.4.3. **Príprava zvierat**

Zdravé mladé zvieratá sa náhodne rozdelia do ošetrovanej a kontrolnej skupiny. Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy kvôli umiestneniu klietok. Zvieratá sa jednoznačne označia a držia vo svojich klietkach aspoň (5) päť dní pred začiatkom štúdie, aby sa aklimatizovali na laboratórne podmienky.

1.4.4. **Cesta podávania a príprava dávok**

Pri tejto metóde testovania sa testovaná látka podáva výlučne orálne. Orálne podávanie môže byť cez sondu, v krmive, v pitnej vode alebo kapsulami. Iné cesty podávania (napr. dermálna alebo inhalačná) sa môžu použiť, ale môže byť potrebné upraviť odporúčané postupy. Rozhodnutie o tom akou cestou sa látka bude podávať závisí na profile expozície ľudí a dostupných toxikologických alebo kinetických informáciách. Je potrebné uviesť zdôvodnenie výberu cesty podávania, ako aj výsledné modifikácie postupov tejto testovacej metódy.

▼B

V prípade potreby sa testovaná látka môže rozpustiť alebo rozptýliť vo vhodnom nosiči. Odporúča sa, aby sa najskôr zvážilo použitie vodného roztoku/suspenzie, potom roztoku/suspenzie v oleji (napr. kukuričný olej) a nakoniec prípadného roztoku/suspenzie v inom nosiči. Toxické vlastnosti nosiča musia byť známe. Okrem toho je potrebné venovať pozornosť týmto charakteristikám nosiča: vplyv nosiča na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo retenciu testovanej látky, ktoré môžu zmeniť jej toxické vlastnosti; a vplyv na spotrebu potravy alebo vody alebo nutričný stav zvierat.

1.5. POSTUPY

1.5.1. **Počet a pohlavie zvierat**

Keď sa štúdia uskutočňuje ako samostatná štúdia, je potrebné použiť aspoň 20 zvierat (10 samíc a 10 samcov) v každej dávkovej a kontrolnej skupine na vyhodnotenie klinických a funkčných vyšetrení. Aspoň päť samcov a päť samíc, vybratých z týchto 10 samcov a 10 samíc, sa pomocou perfúzie fixuje in situ a použije na podrobnú neurohistopatológiu na konci štúdie. V prípade, keď sa iba obmedzený počet zvierat v danej dávkovej skupine vyšetrí na príznaky neurotoxických účinkov, je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa tieto zvieratá zahrnuli k tým, ktoré boli vybraté na perfúziu. Ak sa štúdia uskutočňuje v kombinácii so štúdiou toxicity pri opakovanej dávke, použijú sa vhodné počty zvierat, aby zodpovedali cieľom oboch štúdií. Minimálny počet zvierat na skupinu pre rôzne kombinácie štúdií je uvedený v tabuľke 1. Ak sa po ošetrení plánuje predčasné usmrtenie, alebo sa plánujú skupiny na regeneráciu, aby sa pozorovala reverzibilita, pretrvávanie alebo oneskorený výskyt toxických účinkov, alebo keď sa zvažujú dodatočné vyšetrenia, potom by sa počet zvierat mal zvýšiť, aby sa zabezpečilo, že je k dispozícii potrebný počet zvierat na vyšetrenie a histopatológiu.

1.5.2. **Ošetrovaná a kontrolná skupina**

Zvyčajne sa použijú aspoň tri dávkové skupiny a kontrolná skupina, ale ak sa na základe hodnotenia ďalších údajov neočakávajú žiadne účinky pri opakovanej dávke 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň, môže sa vykonať limitný test. Ak nie sú k dispozícii vhodné údaje, môže sa vykonať štúdia na zistenie rozsahu dávkovania, aby umožnila stanoviť dávky, ktoré sa majú použiť. Okrem ošetrenia s testovanou látkou sa zvieratá v kontrolnej skupine ošetria rovnakým spôsobom ako zvieratá v pokusnej skupine. Ak sa používa nosič pri podávaní testovanej látky, kontrolná skupina dostane nosič v najvyššom používanom objeme.

1.5.3. **Kontrola spoľahlivosti**

Laboratórium, ktoré vykonáva štúdiu, predloží údaje, ktoré dokazujú jeho spôsobilosť vykonať túto štúdiu a citlivosť použitých postupov. Takéto údaje poskytnú dôkaz schopnosti zisťovať a kvantifikovať podľa potreby zmeny v rozličných konečných bodoch, odporúčaných pre pozorovanie, ako napr. autonómne príznaky, senzorická reaktivita, sila uchopenia končatín a motorická aktivita. Informácie o chemikáliách, ktoré spôsobujú rôzne typy neurotoxických reakcií a ktoré by sa mohli použiť ako pozitívne kontrolné látky je možné nájsť v odkazoch 2 až 9. Môžu sa použiť predchádzajúce údaje, ak základné aspekty experimentálnych postupov zostávajú rovnaké. Odporúča sa pravidelná aktualizácia predchádzajúcich údajov. Ak vykonávacie laboratórium zmenilo určitý základný prvok pri uskutočňovaní testu alebo postupov, je potrebné zistiť nové údaje potvrdzujúce nezmenenú citlivosť postupov.

▼B

1.5.4. **Výber dávky**

Veľkosti dávok sa zvolia na základe posúdenia každej už zistenej toxicity a dostupných kinetických údajov pre testovanú látku alebo príbuzné materiály. Najvyššia dávka sa zvolí s cieľom vyvolať neurotoxické účinky alebo jasné účinky systémovej toxicity. Potom sa klesajúca postupnosť hladín dávok zvolí tak, aby sa preukázala každá reakcia súvisiaca s dávkou a najnižšia hladina bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL). V zásade sa hladiny dávok stanovia tak, aby sa primárne toxické účinky na nervový systém dali odlíšiť od účinkov súvisiacich so systémovou toxicitou. Intervaly dávkovania s faktorom dva až tri sú často optimálne a pridanie štvrtej pokusnej skupiny je často vhodnejšie ako používanie veľmi veľkých intervalov (napr. viac ako faktor 10) medzi dávkami. Ak existuje realistický odhad expozície ľudí, tiež sa zohľadní.

1.5.5. **Limitný test**

Ak sa na základe štúdie s jednou dávkou aspoň 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň s použitím postupov, uvedených pre túto štúdiu, nezistia žiadne pozorovateľné neurotoxické účinky a ak sa neočakáva toxicita na základe údajov o štrukturálne príbuzných látkach, potom sa môže upustiť od úplnej štúdie s použitím troch dávok. Z očakávanej expozície ľudí môže vyplývať potreba, aby sa v limitnom teste použili vyššie orálne dávky. V prípade iných druhov podávania, ako je napr. inhalácia alebo dermálna aplikácia, fyzikálno-chemické vlastností testovanej látky často môžu určovať maximálnu prípustnú úroveň expozície. Pre uskutočnenie orálnej akútnej štúdie má byť dávka pre limitný test minimálne 2 000 mg/kg.

1.5.6. **Podávanie dávok**

Zvieratám sa podáva testovaná dávka každý deň, 7 dní v týždni počas obdobia minimálne 28 dní; použitie päťdňového režimu dávkovania alebo kratšiu dobu expozície je potrebné zdôvodniť. Ak sa testovaná látka podáva cez sondu, podáva sa ako jednorazová dávka s použitím žalúdočnej sondy alebo vhodnej intubačnej kanyly. Maximálny objem kvapaliny, ktorý sa môže jednorázovo podať závisí od veľkosti pokusných zvierat. Objem nebude vyšší ako 1 ml/100 g telesnej hmotnosti. V prípade vodných roztokov sa však môže uvážiť použitie do 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. S výnimkou dráždivých alebo žieravých látok, ktoré zvyčajne pri vyšších koncentráciách spôsobia zhoršenie účinkov, variabilita v aplikovanom objeme sa minimalizuje tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem vo všetkých dávkach.

Pre látky podávané v potrave alebo pitnej vode je dôležité zabezpečiť, aby množstvá použitej testovanej látky neinterferovali s normálnou výživovou a vodnou bilanciou. Keď sa testovaná látka podáva v krmive, môže sa použiť buď stála koncentrácia v krmive (ppm) alebo stála veľkosť dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa; iné možnosti sa musia špecifikovať. V prípade, keď sa látka podáva sondou, látka sa podáva približne v rovnaký čas každý deň a prispôsobí sa podľa potreby, aby sa zachovala stála veľkosť dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť. Ak sa uskutoční predbežná štúdia pri opakovaných dávkach pred uskutočnením dlhodobej štúdie, je potrebné v oboch štúdiách použiť podobné krmivo. V prípade akútnych štúdií, keď nie je možná jednorazová dávka, sa dávka môže podávať v menších množstvách v priebehu maximálne 24 hodín.

▼B

1.6. POZOROVANIE

1.6.1. **Frekvencia vyšetrení a testy**

V štúdiách pri opakovaných dávkach vymedzený čas pozorovania pokrýva obdobie dávkovania. V štúdiách akútnej toxicity sa sleduje 14-denné obdobie po ošetrení. V prípade zvierat vo vedľajších skupinách, ktoré sa držia bez expozície počas obdobia po ošetrení, vymedzený čas pozorovania pokrýva aj toto obdobie.

Vyšetrenia sa uskutočnia dostatočne často, aby sa dosiahla maximálna pravdepodobnosť zistenia všetkých behaviorálnych a/alebo neurologických abnormalít. Vyšetrenia sa uskutočnia pokiaľ možno v rovnaký čas každý deň pri zohľadnení obdobia, keď sa predpokladajú maximálne účinky po dávkovaní. Frekvencia klinických vyšetrení a funkčných testov je zosumarizovaná v tabuľke 2. Ak z kinetických alebo iných údajov z predchádzajúcich štúdií vyplýva potreba použiť odlišné časové body pre vyšetrenia, testy alebo obdobia po vyšetrení, prijme sa alternatívny harmonogram, aby sa získalo maximálne množstvo informácií. Uvedie sa zdôvodnenie zmien harmonogramu.

1.6.1.1. *Pozorovania všeobecného zdravotného stavu a mortality/morbidity*

Zdravotný stav všetkých zvierat sa pozorne vyšetrí aspoň raz denne, morbidita a mortalita sa zisťuje aspoň dvakrát denne.

1.6.1.2. *Podrobné klinické vyšetrenia*

Všetky zvieratá vybraté na tento účel sa podrobne klinicky vyšetria (pozri tabuľku 1), jedenkrát pred prvou expozíciou (na umožnenie porovnaní medzi pokusnými zvieratami) a potom v rôznych intervaloch v závislosti na trvaní štúdie (pozri tabuľku 2). Podrobné klinické vyšetrenia vedľajších skupín na regeneráciu sa vykonajú na konci obdobia regenerácie. Podrobné klinické vyšetrenia sa vykonajú mimo domácej klietky v zvyčajnej vyšetrovacej miestnosti. Starostlivo sa zaznamenajú s použitím systému hodnotenia, ktorý zahrnuje kritériá alebo stupnicu hodnotenia pre každé meranie pri vyšetreniach. Použité kritériá alebo stupnice explicitne definuje testovacie laboratórium. Je potrebné vynaložiť úsilie na zabezpečenie, aby zmeny testovacích podmienok boli minimálne (nie systematicky súvisiace s ošetrením) a aby pozorovania vykonávali vyškolení pracovníci, ktorí nie sú oboznámení o prebiehajúcom ošetrení.

Odporúča sa, aby sa pozorovania vykonávali štruktúrovanej podobe, pri ktorej sa presne definované kritéria (vrátane definície normálneho „rozsahu“) systematicky uplatňujú na každé zviera v každom čase pozorovania. „Normálny rozsah“ sa príslušne zdokumentuje. Všetky pozorované príznaky sa zaznamenajú. Vždy, keď je to možné, zaznamená sa aj závažnosť pozorovaných príznakov. Klinicky sa pozorujú okrem iného zmeny na koži, srsti, očiach, slizniciach, výskyt sekrétov a sekrétov a autonómnu aktivitu (napr. slzenie, zježenie, veľkosť zreničky, nezvyčajný priebeh dýchania a/alebo dýchanie ústami, všetky nezvyčajné príznaky pri močení alebo vyprázdňovaní a bezfarebný moč).

▼B

Všetky nezvyčajné reakcie, pokiaľ ide o polohu tela, stupeň aktivity (napr. zvýšený alebo znížený záujem o preskúmanie zvyčajného priestoru) a koordinácia pohybu, sa tiež zaznamenajú. Zmeny chôdze (napr. tackavá chôdza, ataxia), poloha (napr. zhrbená) a reaktivita na zaobchádzanie, premiestnenie alebo iné podnety z prostredia, ako aj výskyt klonických alebo tonických pohybov, kŕče alebo triaška, stereotypy (napr. nadmerná starostlivosť o srsť, nezvyčajné pohyby hlavou, opakovaný beh dokola) alebo zvláštne správanie (napr. hryzenie alebo nadmerné olizovanie, sebamrzačenie, chôdza dozadu, vydávanie zvukov) alebo agresia sa zaznamenajú.

1.6.1.3. *Funkčné testy*

Podobne ako pri podrobných klinických pozorovania, uskutočnia sa funkčné testy raz pred expozíciou a opakovane potom u všetkých zvierat, vybratých na tento účel (pozri tabuľku 1). Frekvencia funkčných testov závisí aj od trvania štúdie (pozri tabuľku 2). Okrem období pozorovania, ako je uvedené v tabuľke 2, sa vykonajú funkčné vyšetrenia vedľajších regenerujúcich skupín čo možno najbližšie k času konečného usmrtenia. Funkčné testy by mali zahrnovať senzorickú reaktivitu na rôznorodé podnety [napr. sluchové, vizuálne a proprioceptívne podnety (5), (6), (7)], hodnotenie sily uchopenia končatín (8) a hodnotenie motorickej aktivity (9). Motorická aktivita sa zmeria automatickým prístrojom, ktorým je možné stanoviť poklesy aj nárasty aktivity. Ak sa použije iný definovaný systém, je potrebné, aby bol kvantitatívny a jeho citlivosť a spoľahlivosť preukázaná. Každý prístroj by mal byť testovaný, aby sa zaručila dlhodobá spoľahlivosť a porovnateľnosť prístrojov. Ďalšie údaje o postupoch, ktoré je možné použiť, sú uvedené v príslušných odkazoch. Ak neexistujú žiadne údaje (napr. štrukturálna aktivita, epidemiologické údaje, iné toxikologické štúdie), z ktorých by vyplývali potenciálne neurotoxické účinky, je potrebné zvážiť zahrnutie špecializovanej ších testov citlivosti a motorickej funkcie alebo schopnosti učiť sa a pamätať si na podrobnejšie preskúmanie týchto možných účinkov. Viac informácií o špecializovanejších testoch a ich používaní sa nachádza v odkaze (1).

Vo výnimočných prípadoch sa zvieratá, ktoré vykazujú príznaky toxicity v miere, ktorá by mohla významne ovplyvniť funkčný test, môžu vylúčiť z takého testu. Uvedie sa zdôvodnenie v prípade vylúčenia zvierat z funkčného testu.

1.6.2. **Telesná hmotnosť a spotreba potravy/vody**

Pri štúdiách s trvaním do 90 dní by sa všetky zvieratá mali odvážiť aspoň raz za týždeň a spotreba potravy (spotreba vody, keď sa testovaná látka podáva cez toto médium) by sa mala zmerať aspoň raz za týždeň. Pri dlhodobých štúdiách by sa všetky zvieratá mali odvážiť aspoň raz za týždeň v prvých 13 týždňoch a potom aspoň raz za každé 4 týždne. Spotreba potravy (spotreba vody, keď sa testovaná látka podáva cez toto médium) by sa mala zmerať aspoň raz za týždeň v prvých 13 týždňoch a potom približne v trojmesačných intervaloch, pokiaľ sa nevyžaduje inak na základe zdravotného stavu alebo telesnej hmotnosti.

▼B

1.6.3. **Oftalmológia**

Pri štúdiách, ktoré trvajú viac ako 28 dní, sa oftalmologicky vyšetria s použitím oftalmoskopu, alebo porovnateľného prístroja, pred podaním testovanej látky a pri ukončení štúdie pokiaľ možno všetky zvieratá alebo aspoň zvieratá v skupinách s vysokými dávkami a kontrolných skupinách. Ak sa zistia zmeny na očiach, alebo ak je to potrebné na základe klinických príznakov, vyšetria sa všetky zvieratá. Pri dlhodobých štúdiách sa oftalmologické vyšetrenie vykoná aj po 13 týždňoch. Oftalomologické vyšetrenia nieje potrebné vykonať, ak sú už tieto údaje dostupné z iných štúdií, ktoré majú podobné trvanie a podobné veľkosti dávok.

1.6.4. **Hematológia a klinická biochémia**

Ak sa štúdia neurotoxicity uskutočňuje v kombinácii so štúdiou systémovej toxicity pri opakovanej dávke, vykonajú sa hematologické a klinicko-biochemické vyšetrenia, ako je uvedené v príslušnej metóde štúdie systémovej toxicity. Vzorky sa získajú tak, aby sa minimalizovali akékoľvek prípadné účinky na neurologické správanie.

1.6.5. **Histopatológia**

Neuropatologické vyšetrenie sa zameria na doplnenie a rozšírenie pozorovaní uskutočnených počas *in vivo* fázy štúdie. Tkanivá od aspoň 5 zvierat/pohlavie/skupinu (pozri tabuľku 1 a ďalší odsek) sa fixujú *in situ* s použitím všeobecne uznaných perfúznych a fixačných techník (pozri odkaz 3, kapitola 5 a odkaz 4, kapitola 50). Všetky viditeľné makroskopické zmeny sa zaznamenávajú. Keď sa štúdia uskutoční ako samostatná štúdia na zistenie neurotoxicity alebo na charakterizáciu neurotoxických účinkov, zvyšné zvieratá sa môžu použiť buď na špecifické neurobehaviorálne (10), (11), neuropatologické (10), (11), (12), (13), neurochemické (10), (11), (14), (15) alebo elektrofyziologické (10), (11), (16), (17) vyšetrenia, ktoré môžu doplniť postupy a vyšetrenia uvedené v tomto materiáli, alebo na zvýšenie počtu histopatologicky vyšetrených jedincov. Tieto dodatočné postupy môžu byť osobitne užitočné, keď empirické pozorovania alebo očakávané účinky indikujú špecifický typ alebo cieľové tkanivo v prípade neurotoxicity (2), (3). Podobe sa zvyšné zvieratá môžu použiť aj na bežné patologické hodnotenia, ako je uvedené v metóde pre štúdie pri opakovaných dávkach.

Všetky vzorky tkanív zaliate v parafíne sa zafarbia zvyčajnou metódou, ako je hematoxylín a eozín (H&E), a mikroskopicky vyšetria. Ak sa zistia alebo predpokladajú príznaky periferálnej neuropatie, vyšetria sa vzorky periferálnych nervov zaliate v umelej hmote. Klinické príznaky môžu tiež poukázať na ďalšie miesta, ktoré je potrebné vyšetriť, alebo na použitie špeciálneho postupu farbenia. Usmernenie o ďalších miestach, ktoré je potrebné vyšetriť, je možné nájsť v odkazoch (3), (4). Vhodné špeciálne farbivá na dôkaz špecifických typov patologických zmien môžu byť tiež užitočné (18).

▼B

Reprezentatívne rezy tkanív centrálneho a periferálneho nervového systému sa histologicky vyšetria (pozri odkaz 3, kapitola 5, a odkaz 4, kapitola 50). Zvyčajne sa vyšetria tieto oblasti: predný mozog, stred veľkého mozgu vrátane rezu cez hipokampus, stredný mozog, malý mozog, most, predĺžená miecha, oko s očným nervom a sietnica, zväčšenie miechy na krčných a bedrových častiach, chrbtové koreňové uzliny, tkanivá chrbtové a dutiny, proximálny sedací nerv, proximálny tibiálny nerv (na kolene) a tibiálne vetvy nervu lýtkového svalu. Rezy tkanív miechy a periferálnych nervov budú obsahovať ako krížové, tak aj priečne a pozdĺžne rezy. Je potrebné venovať pozornosť cievnatosti nervového systému. Vzorka kostrového svalu, predovšetkým lýtkového svalu sa tiež vyšetrí. Osobitnú pozornosť je potrebné venovať oblastiam s bunkovou a vláknitou štruktúrou a vzorke v CNS a PNS, o ktorých je známe, že sú osobitne náchylné na neurotoxikanty.

Poznámky o neuropatologických zmenách, ktoré sú typické na základe expozície toxickej látky, je možné nájsť v odkazoch (3), (4). Odporúča sa postupné vyšetrenie vzoriek tkanív, pri ktorých sa rezy zo skupiny s vysokou dávkou najskôr porovnajú s rezmi z kontrolnej skupiny. Ak sa nezistia žiadne neuropatologické zmeny vo vzorkách z týchto skupín, nie je potrebná ďalšia analýza. Ak sa neuropatologické zmeny zistia v skupine s vysokou dávkou, vzorka z každého potenciálne zasiahnutého tkaniva zo skupín so strednými a nízkymi dávkami sa potom zakóduje a následne vyšetrí.

Ak sa zistí akýkoľvek dôkaz neuropatologických zmien pri kvalitatívnom vyšetrení, vykoná sa druhé vyšetrenie všetkých oblastí nervového systému, kde sa tieto zmeny vyskytnú. Rezy zo všetkých dávkových skupín zo všetkých potenciálne zasiahnutých oblastí sa zakódujú a náhodne vyšetria bez informácií o kóde. Zaznamená sa frekvencia a závažnosť každého poškodenia. Po posúdení všetkých oblastí zo všetkých dávkových skupín sa môže kódovanie zrušiť a môže sa vykonať štatistická analýza na vyhodnotenie vzťahov medzi dávkou a reakciou. Je potrebné opísať príklady rôznych stupňov závažnosti každého poškodenia.

Neuropatologické zistenia by sa mali vyhodnocovať v súvislosti s pozorovaniami a meraniami správania, ako aj s inými údajmi z predchádzajúcich a súčasných štúdií systémovej toxicity testovanej látky.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Je potrebné uviesť jednotlivé údaje. Okrem toho by sa všetky údaje mali zhrnúť v podobe tabuliek, kde sa uvedie pre každú pokusnú a kontrolnú skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu, alebo sa usmrtili z humánnych dôvodov, čas každého uhynutia alebo humánneho usmrtenia, popis príznakov zistenej toxicity, vrátane času nástupu, trvania, typu a závažnosti toxických účinkov, počet zvierat vykazujúcich poškodenia, vrátane typu a závažnosti poškodení.

▼B

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Zistenia zo štúdie sa vyhodnocujú na základe výskytu, závažnosti a vzájomného vzťahu medzi neurobehaviorálnymi a neuropatologickými účinkami (aj neurochemické alebo elektrofyziologické účinky, ak sa vykonali aj ďalšie vyšetrenia) a všetky ostatné zistené nepriaznivé účinky. Ak je to možné číselné výsledky sa vyhodnotia vhodnou a všeobecne akceptovateľnou štatistickou metódou. Štatistické metódy by sa mali vybrať počas prípravnej fázy štúdie.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter (vrátane izomerizácie, čistoty a fyzikálno-chemických vlastností),

— identifikačné údaje.

Nosič (v prípade potreby):

— zdôvodnenie výberu nosiča.

Pokusné zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky umiestnenia, aklimatizácia, krmivo atď.,

— hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku testu.

Testovacie podmienky:

— údaje o príprave testovanej látky/krmiva, dosiahnutých koncentráciách, stabilite a homogenite prípravku,

— špecifikácia podávaných dávok, vrátane údajov o nosiči, objeme a fyzikálnej forme podávaného materiálu,

— údaje o podávaní testovanej látky,

— zdôvodnenie výberu veľkosti dávok,

— zdôvodnenie cesty podávania a trvania expozície,

— prepočet koncentrácie testovanej látky v krmive/pitnej vode (ppm) na skutočnú dávku (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), ak je potrebné,

— údaje o kvalite krmiva a vody.

Pozorovania a postupy testovania:

— údaje o zaradení zvierat v jednotlivých skupinách do podskupín na perfúzne fixovanie,

— údaje o systémoch hodnotenia, vrátane kritérií a stupníc hodnotenia pre každé meranie v podrobných klinických vyšetreniach,

▼B

— údaje o funkčných testoch na senzorickú reaktivitu na rôznorodé podnety (napr. sluchové, vizuálne a proprioceptívne podnety); na hodnotenie sily uchopenia končatín a na hodnotenie motorickej aktivity (vrátane údajov o automatických prístrojoch na zistenie aktivity) a iné použité postupy,

— údaje o oftalmologických vyšetreniach a v prípade potreby hematologických vyšetreniach a klinicko-biochemických testoch s príslušnými základnými hodnotami,

— údaje pre špecifické neurobehaviorálne, neuropatologické, neurochemické alebo elektrofyziologické postupy.

Výsledky:

— telesná hmotnosť/zmeny telesnej hmotnosti, vrátane telesnej hmotnosti v čase usmrtenia,

— spotreba potravy a vody, podľa potreby,

— údaje o toxickej reakcii podľa pohlavia a dávky, vrátane príznakov toxicity alebo mortality,

— charakter, závažnosť a trvanie (čas nástupu a následný priebeh) podrobných klinických vyšetrení (s údajmi o reverzibilite),

— podrobný popis všetkých výsledkov funkčných testov,

— nálezy z autopsie,

— podrobný popis všetkých neurobehaviorálnych, neuropatologických a neurochemických alebo elektrofyziologických nálezov, ak sú k dispozícii,

— údaje o absorpcii a metabolizme, ak sú k dispozícii,

— štatistické spracovanie výsledkov v prípade potreby.

Diskusia k výsledkom:

— informácie o reakcii na dávku,

— vzťah medzi inými toxickými účinkami pre výsledné posúdenie neurotoxického potenciálu testovanej chemikálie,

— hladina bez pozorovaného nepriaznivého účinku.

Závery:

— potrebné je konkrétne stanovisko k celkovej neurotoxicite testovanej chemikálie.

4. **ODKAZY**

(1) OECD Giudance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, In Preparation.

(2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.

(3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

(4) Spencer, 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, 999 – 1003.

(6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 691 – 704.

(7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, 267 – 283.

(8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233 – 236.

(9) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599 – 609.

(10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (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, 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, 445 – 452.

(15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368 – 378.

(16) Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp 299 – 335.

(17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co.,. Baltimore, London, pp. 726 – 742.

(18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

Tabuľka 1

Minimálny počet zvierat potrebných na skupinu, keď sa štúdia neurotoxicity uskutočňuje samostatne alebo v kombinácii s inými štúdiami

	ŠTÚDIA NEUROTOXICITY SA USKUTOČŇUJE AKO:			
	Samostatná štúdia	Kombinovaná štúdia s 28-dennou štúdiou	Kombinovaná štúdia s 90-dennou štúdiou	Kombinovaná štúdia so štúdiou chronickej toxicity
Celkový počet zvierat na skupinu	10 samcov a 10 samíc	10 samcov a 10 samíc	15 samcov a 15 samíc	25 samcov a 25 samíc
Počet zvierat vybratých na funkčné testovanie, vrátane podrobných klinických vyšetrení	10 samcov a 10 samíc	10 samcov a 10 samíc	10 samcov a 10 samíc	10 samcov a 10 samíc
Počet zvierat vybratých na perfúznu fixáciu *in situ* a neurohistopatológiu	5 samcov a 5 samíc	5 samcov a 5 samíc	5 samcov a 5 samíc	5 samcov a 5 samíc
Počet zvierat vybratých na vyšetrenia toxicity pri opakovanej dávke/subchronickej/chronickej toxicity, hematológiu, klinickú biochémiu, histopatológiu atď., ako sa uvádza v príslušných usmerneniach (*Guidelines*)		5 samcov a 5 samíc	10 samcov † a 10 samíc †	20 samcov † a 20 samíc †
Doplňujúce vyšetrenia, podľa potreby	5 samcov a 5 samíc			

† Vrátane piatich zvierat vybratých na funkčné testovanie a podrobné klinické vyšetrenia ako súčasť štúdie neurotoxicity.

▼B

Tabuľka 2

Frekvencia klinických vyšetrení a funkčné testy

Typ vyšetrení		Trvanie štúdie			
		Akútna	28-denná	90-denná	Chronická
U všetkých zvierat	Všeobecný zdravotný stav	denne	denne	denne	denne
	Mortalita/morbidita	dvakrát denne	dvakrát denne	dvakrát denne	dvakrát denne
U zvierat vybratých na funkčné vyšetrenia	Podrobné klinické vyšetrenia	— pred prvou expozíciou — počas 8 hodín po podaní dávky v čase očakávaného maximálneho účinku — v deň 7 a 14 po podaní dávky	— pred prvou expozíciou — potom jedenkrát týždne	— pred prvou expozíciou — počas prvého alebo druhého týždňa expozície — potom mesačne	— pred prvou expozíciou — jedenkrát na konci prvého mesiaca expozície — potom každé tri mesiace
	Funkčné testy	— pred prvou expozíciou — počas 8 hodín po podaní dávky v čase očakávaného maximálneho účinku — v deň 7 a 14 po podaní dávky	— pred prvou expozíciou — počas štvrtého týždňa ošetrenia čo možno najbližšie ku koncu obdobia expozície	— pred prvou expozíciou — jedenkrát počas prvého alebo druhého týždňa expozície — potom mesačne	— pred prvou expozíciou — jedenkrát na konci prvého mesiaca expozície — potom každé tri mesiace

▼B

B.44. **ABSORPCIA KOŽOU: METÓDA *IN VIVO***

1. **METÓDA**

Táto testovacia metóda je ekvivalentná OECD TG 427 (2004).

1.1. ÚVOD

Mnohé chemické látky pôsobia predovšetkým cez kožu, zatiaľ čo vo väčšine toxikologických štúdií na laboratórnych zvieratách sa používa perorálny spôsob podania. Štúdia perkutánnej absorpcie *in vivo* stanovená týmto usmernením poskytuje prepojenie potrebné pre extrapoláciu perorálnych štúdií, keď sa vykonáva posudzovanie bezpečnosti po dermálnej expozícii.

Kým sa látka môže dostať do krvného obehu, musí preniknúť cez veľký počet bunkových vrstiev. Vrstva určujúca rýchlosť je pre väčšinu látok *stratum corneum* pozostávajúca z mŕtvych buniek. Priepustnosť cez kožu závisí tak od lipofility chemickej látky, ako aj od hrúbky vonkajšej vrstvy epidermy a od faktorov, ako sú napríklad molekulová hmotnosť a koncentrácia látky. Vo všeobecnosti je koža potkanov a králikov priepustnejšia ako koža človeka, kým priepustnosť kože morčiat a opíc sa väčšmi podobá priepustnosti ľudskej kože.

Metódy merania perkutánnej absorpcie možno rozdeliť do dvoch kategórií; *in vivo* a *in vitro.* Metóda *in vivo* dokáže poskytnúť dobré informácie o absorpcii kožou pri rôznych druhoch laboratórnych zvierat. Nedávno sa vyvinuli metódy *in vitro.* Tieto metódy využívajú transport cez celú alebo čiastočnú hrúbku kože zvieraťa alebo človeka do zásobníka tekutiny. Metóda *in vitro* je opísaná v samostatnej testovacej metóde (1). Na pomoc pri výbere najvhodnejšej metódy v danej situácii sa odporúča preštudovať *OECD Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies* (2), pretože uvádza sa tam viac podrobností o vhodnosti metód *in vivo,* ako aj *in vitro.*

Pri metóde *in vivo,* ktorá sa tu opisuje, je možné určiť prienik testovanej látky cez kožu do krvného obehu. Táto technika sa široko používa mnoho rokov (3), (4), (5), (6), (7). Hoci štúdie perkutánnej absorpcie *in vitro* môžu byť v mnohých prípadoch vhodné, môžu sa vyskytnúť situácie, keď potrebné údaje môže poskytnúť iba štúdia *in vivo.*

Výhody metódy *in vivo* sú, že používa fyziologicky a metabolicky nedotknutý systém, používa živočíšne druhy spoločné mnohým štúdiám toxicity a možno ju modifikovať na použitie s inými živočíšnymi druhmi. Nevýhodami sú používanie živých zvierat, potreba rádioaktívne označeného materiálu na dosiahnutie spoľahlivých výsledkov, ťažkosti pri stanovovaní počiatočnej fázy absorpcie a rozdiely v priepustnosti kože uprednostňovaných druhov (potkan) a ľudskej kože. Zvieracia koža je vo všeobecnosti priepustnejšia, a preto v prípade človeka môže dôjsť k nadhodnoteniu perkutánnej absorpcie (6), (8), (9). Leptavé/žieravé látky by sa nemali testovať na živých zvieratách.

▼B

1.2. VYMEDZENIE POJMOV

Neabsorbovaná dávka: predstavuje dávku zmytú z povrchu kože po expozícii a akékoľvek množstvo prítomné na neokluzívnom krycom materiáli, vrátane akejkoľvek dávky, ktorá sa preukázateľne odparila z kože počas expozície.

Absorbovaná dávka*(in vivo):* dávka prítomná v moči, vo zvyškoch v klietke, výkaloch, vydychovanom vzduchu (ak sa meria), krvi, tkanivách (ak sa odoberajú) a v zostávajúcich častiach mŕtveho tela po odstránení kože z miesta aplikácie.

Absorbovateľná dávka: je dávka, ktorá je prítomná na koži alebo v koži po omytí.

1.3. PODSTATA TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka, prednostne rádioaktívne označená, sa nanesie na ostrihanú kožu zvierat v jednej úrovni dávky alebo vo viacerých primeraných úrovniach dávok v podobe reprezentatívnej vzorky používaného prípravku. Testovací prípravok možno ponechať v styku s kožou na vopred určený čas pod vhodným krycím materiálom (neokluzívnym, polookluzívnym alebo okluzívnym), aby sa zabránilo požitiu testovacieho prípravku. Po uplynutí času pôsobenia sa krycí materiál odstráni a koža sa vyčistí vhodným čistiacim činidlom, krycí materiál a čistiaci materiál sa uchovajú na analýzu a aplikuje sa nový krycí materiál. Zvieratá sú pred dobou expozície, počas nej a po nej umiestnené v jednotlivých metabolických klietkach a exkrementy a vydychovaný vzduch sa počas tejto doby odoberajú na analýzu. Zber vydýchaného vzduchu možno vynechať, ak sú dostatočné informácie o tom, že sa vytvára málo prchavý rádioaktívny metabolit alebo sa nevytvára. Každá štúdia bude zvyčajne obsahovať niekoľko skupín zvierat, ktoré budú exponované testovaciemu prípravku. Jedna skupina bude na konci expozičnej doby usmrtená. Ostatné skupiny budú usmrtené v naplánovaných časových intervaloch (2). Po uplynutí času odberu vzoriek sa usmrtia ostatné zvieratá, na analýzu sa odoberie ich krv, miesto aplikácie sa odoberie na analýzu a mŕtve telá sa analyzujú so zreteľom na prítomnosť nevylúčeného materiálu. Vzorky sa analyzujú vhodnými prostriedkami a vykoná sa odhad miery perkutánnej absorpcie (6), (8), (9).

1.4. OPIS METÓDY

1.4.1. **Výber živočíšnych druhov**

Najčastejšie používaným živočíšnym druhom je potkan, možno však použiť aj kmene bez srsti a druhy zvierat, ktorých absorpcia kožou sa väčšmi podobná absorpcii ľudskou kožou (3), (6), (7), (8), (9). Mali by sa používať mladé dospelé zdravé zvieratá rovnakého pohlavia (automatiky zvoleným pohlavím sú samce) kmeňov bežne využívaných v laboratóriách. Na začiatku štúdie by hmotnostné odchýlky medzi použitými zvieratami nemali prevyšovať priemernú hmotnosť o viac než ± 20 %. Vhodní sú napríklad samce potkanov s hmotnosťou 200 g – 250 g, najmä samce v hornej polovici tohto hmotnostného rozsahu.

▼B

1.4.2. **Počet zvierat a ich pohlavie**

Pre každý testovací prípravok a pre každý stanovený čas skončenia treba použiť skupinu najmenej štyroch zvierat rovnakého pohlavia. Každá skupina zvierat bude usmrtená po inom časovom intervale, napríklad na konci expozície (zvyčajne 6 alebo 24 hodín) a pri následných príležitostiach (napr. 48 a 72 hodín). Ak sú dostupné údaje, ktoré predstavujú podstatné rozdiely v dermálnej toxicite medzi samcami a samicami, malo by sa vybrať pohlavie, ktoré je citlivejšie. Ak takéto údaje nie sú dostupné, možno použiť hociktoré pohlavie.

1.4.3. **Podmienky umiestnenia a kŕmenia**

Teplota experimentálnej miestnosti, kde sú zvieratá umiestnené, by mala byť 22 °C (± 3 °C). Hoci relatívna vlhkosť by mala byť najmenej 30 % a prednostne by nemala presiahnuť 70 %, okrem času čistenia miestnosti, cieľom by mala byť 50 – 60 % vlhkosť. Osvetlenie by malo byť umelé so striedaním 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie možno použiť konvenčnú laboratórnu potravu, ktorá by mala byť voľne dostupná spolu s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Počas vykonávania štúdie a prednostne takisto počas aklimatizácie sa zvieratá umiestnia jednotlivo do metabolických klietok. Keďže rozsypaná potrava a rozliata voda by mohli ohroziť kvalitu výsledkov, mala by sa minimalizovať pravdepodobnosť takýchto udalostí.

1.4.4. **Príprava zvierat**

Zvieratá sú označené spôsobom, ktorým sa umožňuje ich individuálna identifikácia, a umiestnia sa do klietok minimálne päť dní pred začiatkom štúdie, aby sa umožnila ich aklimatizácia na laboratórne podmienky.

Po uplynutí aklimatizačného obdobia a približne 24 hodín pred aplikáciou dávok sa na každom zvierati ostrihá z kože srsť v oblasti pliec a chrbta. Vlastnosti priepustnosti poškodenej a nepoškodenej kože sa líšia a treba dbať na to, aby sa zabránilo odieraniu kože. Po odstránení srsti a približne 24 hodín pred aplikovaním testovanej látky na kožu (pozri oddiel 1.4.7) treba povrch kože utrieť acetónom, aby sa odstránil kožný maz. Ďalšie umytie mydlom a vodou sa neodporúča, pretože akýkoľvek zvyšok mydla by mohol podporiť absorpciu testovanej látky. Plocha aplikácie musí byť dostatočne veľká, aby bolo možné spoľahlivo vypočítať absorbované množstvo testovanej chemickej látky na cm^2 kože, prednostne najmenej na 10 cm^2. Takáto plocha je prakticky možná v prípade potkanov s telesnou hmotnosťou 200 – 250 g. Po príprave sú zvieratá vrátené do metabolických klietok.

1.4.5. **Testovaná látka**

Testovaná látka je entita, ktorej penetračné vlastnosti sa majú zisťovať. V ideálnom prípade by testovaná látka mala byť rádioaktívne označená.

1.4.6. **Testovací prípravok**

Príprava testovanej látky (napr. čistý, zriedený alebo podľa receptu pripravený materiál obsahujúci testovanú chemickú látku, ktorá sa aplikuje na kožu) by mala byť rovnaká (alebo by mala byť realistickou náhradkou) ako v prípade látky, ktorej môžu byť exponovaní ľudia alebo iné potenciálne cieľové živočíšne druhy. Akékoľvek odchýlky od „používaného“ prípravku, sa musia zdôvodniť. Ak je to potrebné, testovaná látka sa rozpustí alebo suspenduje vo vhodnom prenášači. V prípade prenášačov odlišných od vody by mali byť známe absorpčné charakteristiky a potenciálna interakcia s testovanou látkou.

▼B

1.4.7. **Aplikácia na kožu**

Na povrchu kože sa vymedzí miesto aplikácie so špecifickou veľkosťou povrchu. Potom sa na toto miesto rovnomerne aplikuje známe množstvo testovacieho prípravku. Toto množstvo by zvyčajne malo imitovať množstvo, ktorému je potenciálne exponovaný človek, zvyčajne 1 – 5 mg/cm^2 pre tuhú látku alebo do 10 µl/cm^2 pre tekutiny. Akékoľvek iné množstvá by sa mali zdôvodniť predpokladanými podmienkami používania, cieľmi štúdie alebo fyzikálnymi vlastnosťami testovacieho prípravku. Po aplikácii musí byť takto ošetrené miesto chránené pred zotretím. Príklad typického zariadenia je uvedený na obrázku 1. Miesto aplikácie sa zvyčajne chráni neokluzívnym krycím materiálom (napr. krycí materiál z priepustnej nylonovej gázy). Pri neurčitých aplikáciách však treba miesto aplikácie uzavrieť. V prípade, že vyparovaním stredne prchavých testovaných látok sa miera výťažnosti testovanej látky znižuje na neprijateľnú úroveň (pozri tiež oddiel 1.4.10 prvý odsek), vyparenú látku je potrebné zachytiť vo filtri z aktívneho uhlia pokrývajúcim aplikačné zariadenie (pozri obrázok 1). Dôležité je, aby aplikačné zariadenie nepoškodzovalo kožu a aby neabsorbovalo testovací prípravok a nereagovalo s ním. Zvieratá sú vrátené do jednotlivých metabolických klietok na zber exkrementov.

1.4.8. **Trvanie expozície a odber vzoriek**

Trvanie expozície predstavuje časový interval medzi aplikáciou a odstránením testovacieho prípravku omytím kože. Mala by sa používať vhodná expozičná doba (zvyčajne 6 alebo 24 hodín) na základe predpokladanej dĺžky expozície človeka. Po expozičnej dobe sa zvieratá držia v metabolických klietkach až do stanoveného skončenia štúdie. Zvieratá treba pozorovať v pravidelných intervaloch počas celého trvania štúdie, či nevykazujú príznaky toxicity/abnormálnych reakcií. Na konci expozičnej doby by sa ošetrená koža mala prehliadnuť, či sú na nej viditeľné znaky podráždenia.

Metabolické klietky by mali počas štúdie umožňovať samostatný odber moču a fekálií. Mali by tiež umožňovať odber oxidu uhličitého ^{14}C a prchavých zlúčenín uhlíka ^{14}C, ktoré by sa mali analyzovať, ak sa vytvárajú vo veľkom množstve (> 5 %). Moč, fekálie a zachytené tekutiny (napr. oxid uhlíka ^{14}C a prchavé zlúčeniny ^{14}C) by sa mali jednotlivo zberať pri každej skupine v každom čase odberu vzoriek. Ak existuje dostatok informácií o tom, že sa vytvára iba málo prchavý rádioaktívny metabolit alebo sa nevytvára, môžu sa použiť otvorené klietky.

Exkrementy sa zbierajú počas doby pôsobenia do 24 hodín od prvého styku s kožou a potom denne do konca experimentu. Hoci zvyčajne budú stačiť tri intervaly zberu exkrementov, predpokladaný účel testovacieho prípravku alebo existujúce kinetické údaje môžu naznačiť vhodnejšie alebo ďalšie časy pre štúdiu.

Na konci expozičnej doby sa ochranné zariadenie odstráni z každého zvieraťa a odloží sa oddelene na vykonanie analýzy. Exponovaná koža všetkých zvierat by sa mala omyť najmenej trikrát čistiacim činidlom s použitím vhodných tampónov. Musí sa postupovať opatrne, aby nedošlo ku kontaminácii ostatných častí tela. Čistiacim činidlom by mal byť prostriedok používaný na bežnú hygienu, napr. vodný roztok mydla. Nakoniec by sa koža mala vysušiť. Všetky tampóny a činidlá použité na omývanie, sa musia odložiť na analýzu. Zvieratám v skupinách, ktoré budú zachované na neskoršie pozorovanie, treba pred ich vrátením do jednotlivých klietok aplikovať čerstvý kryt na ochranu exponovaného miesta.

▼B

1.4.9. **Záverečné postupy**

Jednotlivé zvieratá z každej skupiny by sa mali usmrtiť v plánovanom čase a mala by sa odobrať krv na analýzu. Ochranné zariadenie alebo krycí materiál treba odobrať na analýzu. Z každého zvieraťa by sa na osobitnú analýzu mala odobrať koža z miesta aplikácie a vzorka neošetrenej kože z podobnej oblasti zbavenej srsti. Miesto aplikácie možno rozdeliť oddelením *stratum corneum* od spodnej epidermy, aby sa získalo viac údajov o distribúcii testovanej látky. Stanovenie časovej závislosti tejto distribúcie po expozičnej dobe by malo poskytnúť niektoré údaje o osude testovanej chemickej látky v *stratum corneum.* Na uľahčenie rozdelenia kože (po konečnom omytí kože a usmrtení zvieraťa) sa odstránia všetky ochranné kryty. Z potkana s vyreže koža v mieste aplikácie vrátane kruhového okraja kože a prišpendlí sa na dosku. Na povrch kože sa pomocou jemného tlaku pritlačí prúžok lepiacej pásky a táto páska sa potom odstráni spolu s časťou *stratum corneum.* Postupne sa aplikujú ďalšie prúžky pásky, až kým sa už páska nelepí na povrch kože a celá vrstva *stratum corneum* je odstránená Pre každé zviera možno všetky prúžky pásky vložiť spolu do jedného zásobníka, do ktorého sa pridá činidlo na rozpad tkanív, ktorým sa rozpustí *stratum corneum.* Všetky potenciálne cieľové tkanivá možno odobrať na samostatné meranie skôr, ako sa analyzujú telesné zvyšky so zreteľom na dávku absorbovanú mŕtvym telom. Mŕtve telá jednotlivých zvierat by sa mali odložiť na analýzu. Zvyčajne stačí analýza celkového obsahu. Cieľové orgány sa môžu odobrať na samostatnú analýzu (ak to indikujú iné štúdie). Moč, ktorý sa nachádza v močovom mechúre v čase usmrtenia, by sa mal pridať k moču odobratému predtým. Po zbere exkrementov z metabolických klietok v plánovanom čase usmrtenia by sa klietky a ich príslušenstvo mali umyť vhodným rozpúšťadlom. Podobne by sa malo analyzovať ostatné potenciálne kontaminované vybavenie.

1.4.10. **Analýza**

Vo všetkých štúdiách treba dosiahnuť adekvátnu výťažnosť (t. j. stredné hodnoty 100 ± 10 % rádioaktivity). Výťažnosť mimo tohto rozsahu sa musí zdôvodniť. Množstvo podanej dávky v každej vzorke by sa malo analyzovať pomocou vhodne validovaných postupov.

Štatistické hodnotenie by malo obsahovať mieru rozptylu opakovaných meraní pre každú aplikáciu.

2. **ÚDAJE**

Na každom zvierati, v každom stanovenom čase odberu vzorky by sa pre testovanú chemickú látku a/alebo metabolity mali vykonať nasledujúce merania. Okrem jednotlivých údajov by sa mali hlásiť stredné hodnoty údajov zoskupených podľa časov odberu vzoriek.

— množstvo spojené s ochrannými prostriedkami,

— množstvo, ktoré možno uvoľniť z kože,

— množstvo v/na koži, ktoré nemožno zmyť z kože,

▼B

— množstvo obsiahnuté v odobratej vzorke krvi,

— množstvo obsiahnuté v exkrementoch a vo vydychovanom vzduchu (ak je to relevantné),

— množstvo, ktoré zostalo v mŕtvom tele a vo všetkých orgánoch odobratých na samostatnú analýzu.

Množstvo testovanej látky a/alebo metabolitov v exkrementoch, vydychovanom vzduchu, krvi a v mŕtvom tele umožní stanoviť celkové množstvo absorbované v každom čase odberu vzoriek. Možno urobiť aj výpočet množstva testovanej látky absorbovanej jedným cm^2 kože exponovanej testovanej látke počas expozičnej doby.

3. **SPRÁVY**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí zahŕňať požiadavky stanovené v protokole vrátane zdôvodnenia použitého testovacieho systému a mala by obsahovať tieto údaje:

Testovaná látka:

— identifikačné údaje [napr. číslo CAS, ak je k dispozícii; zdroj; čistota (rádiochemická čistota); známe nečistoty; číslo šarže],

— fyzikálna povaha, fyzikálno-chemické vlastnosti (napr. pH, prchavosť, rozpustnosť, stabilita, molekulová hmotnosť a log P_{ow}.

Testovací prípravok:

— zloženie a zdôvodnenie použitia,

— podrobnosti o testovacom prípravku, aplikované množstvo, dosiahnutá koncentrácia, prenášač, stabilita a homogénnosť.

Pokusné zvieratá:

— použitý živočíšny druh/kmeň,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj zvierat, podmienky umiestnenia, diéta atď.,

— hmotnosť jednotlivých zvierat na začiatku testu.

Podmienky na vykonanie testu:

— podrobnosti o podaní testovacieho prípravku (miesto aplikácie, analytické metódy, okluzívne/neokluzívne, objem, extrakcia, detekcia,

— podrobnosti o kvalite potravy a vody.

Výsledky:

— všetky príznaky toxicity,

— údaje o absorpcii v tabuľkovej forme (vyjadrené ako rýchlosť, množstvo alebo percentuálny podiel),

▼B

— celková výťažnosť experimentu,

— interpretácia výsledkov, porovnanie so všetkými dostupnými údajmi o perkutánnej absorpcii testovacej zlúčeniny.

Rozbor výsledkov

Závery

4. **ODKAZY NA LITERATÚRU**

(1) Testing Method B.45. Skin Absorption: *In vitro* Method.

(2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

(3) ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

(4) Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8(5), 829 – 835.

(5) Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA

(6) EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

(7) EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

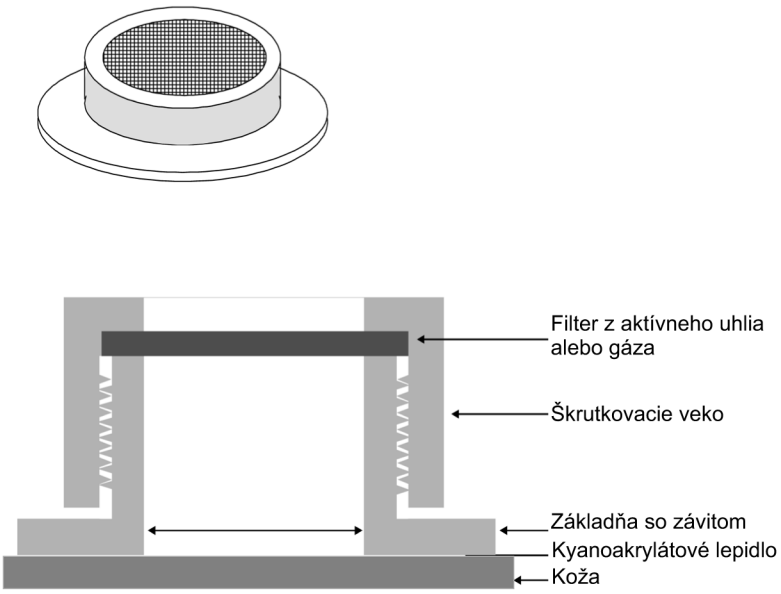
(8) Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369 – 373.

(9) Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54, 399 – 404.

▼B

Obrázok 1

Príklad konštrukčného riešenia typického zariadenia používaného na vymedzenie a ochranu miesta dermálnej aplikácie počas štúdií perkutánnej absorpcie *in vivo*



▼B

B.45. **ABSORPCIA KOŽOU: METÓDA *IN VITRO***

1. **METÓDA**

Táto testovacia metóda je ekvivalentná OECD TG 428 (2004).

1.1. ÚVOD

Táto metóda je určená na poskytnutie informácií o absorpcii testovanej chemickej látky aplikovanej na vyrezanú kožu. Možno ju kombinovať buď s metódou pre absorpciu kože: metóda *in vivo* (1), alebo sa môže použiť samostatne. Odporúča sa prečítať si Usmerňovaci dokument OECD (OECD Guidance Document) pre vykonávanie štúdií kožnej absorpcie (2), ktorý slúži ako pomôcka pri príprave štúdií založených na tejto metóde. Usmerňovaci dokument bol pripravený s cieľom uľahčiť výber vhodných postupov *in vitro* na použitie v konkrétnych podmienkach, aby sa zaistila spoľahlivosť výsledkov získaných pomocou tejto metódy.

Metódy určené na meranie kožnej absorpcie a prestupu látky kožou je možné rozdeliť do dvoch kategórií: *in vivo a in vitro.* Metódy merania kožnej absorpcie *in vivo* sú dobre zavedené a poskytujú farmakokinetické informácie v rozsahu živočíšnych druhov. Metóda *in* vivo je samostatne opísaná v inej testovacej metóde (1). Metódy *in vitro* sa taktiež používajú mnoho rokov na meranie kožnej absorpcie. Hoci sa formálne validačné štúdie metód *in vitro,* ktoré sú zahrnuté v tejto testovacej metóde, dosiaľ nevykonali, odborníci OECD sa v r. 1999 zhodli, že bolo vyhodnotených dostatočné množstvo údajov na podporu metódy *in vitro* (3). V Usmerňovacom dokumente OECD (2) sú uvedené ďalšie podrobné informácie na podporu metód *in vitro,* vrátane veľkého počtu priamych porovnaní metód *in vitro a in vivo.* Existuje veľa monografií zaoberajúcich s touto problematikou, ktoré poskytujú podrobné základné informácie o používaní metódy *in vitro* (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12). Pri metódach *in vitro* sa meria difúzia chemických látok do kože a ich prienik cez kožu do rezervoáru s tekutinou a môže sa použiť aj neživá koža iba na meranie difúzie, alebo čerstvá metabolicky aktívna koža na súbežné meranie difúzie metabolizmu kože. Tieto metódy našli svoje konkrétne využitie najmä pri porovnávaní prestupu chemických látok do kože a cez kožu z rozličných prípravkov, pričom môžu takisto slúžiť ako užitočné modely na posúdenie perkutánnej absorpcie u človeka.

Táto metóda *in vitro* sa nemôže použiť vo všetkých situáciách a pri všetkých triedach chemických látok. Na úvodné kvalitatívne hodnotenie prieniku látky kožou je možné použiť testovaciu metódu *in vitro.* V niektorých prípadoch môže byť potrebné pokračovať ďalej s údajmi získanými pomocou metódy *in vivo.* Na ďalšie posúdenie situácií, pre ktoré môže byť vhodná metóda *in vitro,* by sa malo postupovať podľa usmerňovacieho dokumentu (2). Ďalšie podrobné informácie na podporu rozhodnutia sú uvedené v (3).

Táto metóda uvádza všeobecné zásady na meranie dermálnej absorpcie a doplňovania testovanej látky s použitím vyrezanej kože. Možno použiť kožu z mnohých cicavcov vrátane človeka. Priepustnosť kože sa zachováva aj po vyrezaní z tela, pretože hlavnou difúznou bariérou je neživá rohovitá vrstva kože *(stratum corneum);* aktívny prenos chemikálií cez kožu sa dosiaľ nedokázal. Ukázalo sa, že koža má schopnosť metabolizovať niektoré chemikálie počas perkutánnej absorpcie (6), ale tento proces nie je limitujúci v zmysle skutočne absorbovanej dávky, aj keď môže mať vplyv na povahu materiálu prechádzajúceho do krvného obehu.

▼B

1.2. VYMEDZENIE POJMOV

Neabsorbovaná dávka: predstavuje dávku, ktorá sa zmyla z povrchu kože po expozícii, a každú prítomnú na neokluzívnom pokrytí vrátane každej dávky, ktorá sa odparila z kože počas expozície.

Absorbovaná dávka *(in vitro):* hmota testovanej látky, ktorá sa počas určeného času dostala do receptorovej kvapaliny alebo do krvného obehu.

Absorbovateľná dávka *(in vitro):* predstavuje dávku prítomnú na koži alebo v koži po omytí.

1.3. PODSTATA TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka, ktorá môže byť rádioaktívne označená, sa nanesie na povrch vzorky kože oddeľujúcej dve komôrky difúznej bunky. Prv ako sa daná chemická látka odstráni vhodným čistiacim postupom, zostáva na koži počas stanoveného času a za určených podmienok. Počas experimentu sa v stanovených časových bodoch odoberajú vzorky receptorovej kvapaliny a analyzujú z hľadiska prítomnosti testovanej chemickej látky a/alebo metabolitov.

Ak sa používajú metabolicky aktívne systémy, pomocou príslušných metód je možné analyzovať metabolity testovaných chemických látok. Na konci experimentu sa prípadne môže vypočítať distribúcia testovanej chemickej látky a jej metabolitov.

Vo vhodných podmienkach, ktoré sú opísané v tejto metodike a usmerňovacom dokumente (2), sa meria absorpcia testovanej látky počas stanoveného obdobia pomocou analýzy tekutiny v receptorovej kvapaline a ošetrenej kože. Testovaná látka, ktorá zostala v koži, by sa mala pokladať za absorbovanú, ak nemožno preukázať, že absorpciu možno stanoviť na základe hodnôt nameraných v receptorovej kvapaline. Analýza ďalších komponentov (materiál zmytý s kože a zostávajúci vo vrstvách kože) umožňuje vyhodnotenie ďalších údajov, vrátane celkovej distribúcie testovanej látky a percentuálneho podielu výťažnosti testovanej látky.

Na preukázanie funkčnosti a spoľahlivosti testovacieho systému v realizačnom laboratóriu by mali byť dostupné výsledky príslušných referenčných chemických látok a tieto výsledky by mali byť v súlade s uverejnenou literatúrou pre použitú metódu. Túto požiadavku možno splniť testovaním vhodnej referenčnej látky (podľa možnosti s lipofíliou podobnou ako má testovaná látka) súčasne s testovanou látkou alebo poskytnutím adekvátnych údajov z minulosti o mnohých referenčných látkach s rôznou lipofíliou (napr. kofeín, kyselina benzoová a testosterón).

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Difuzér**

Difuzér pozostáva z donorovej komory a receptorovej komory, medzi ktoré sa vkladá koža (príklad typického riešenia difuzéra je zobrazený na obr. 1). Difuzér by mal poskytovať dobré utesnenie okolo kože, umožňovať ľahké odoberanie vzoriek, dobré miešanie receptorového roztoku, ktorý je v kontakte so spodnou stranou kože, a dobrú reguláciu teploty difuzéra a jeho obsahu. Prijateľné sú jednak statické a jednak prietokové difuzéry. Donorové komory sa zvyčajne ponechávajú počas expozície neuzavreté do konečnej dávky testovacieho prípravku. Pri nekonečných aplikáciách a pri niektorých scenároch konečných dávok je však možné donorové komory uzavrieť.

▼B

1.4.2. **Receptorová kvapalina**

Uprednostňuje sa použitie fyziologicky vodivej receptorovej kvapaliny, hoci sa môžu použiť aj iné, ak sa to zdôvodní. Treba uviesť presné zloženie receptorovej kvapaliny. Mala by sa preukázať adekvátna rozpustnosť testovanej chemickej látky v receptorovej kvapaline, aby nepôsobila ako prekážka pre absorpciu. Okrem toho by receptorová kvapalina nemala mať vplyv na integritu kožného preparátu. Rýchlosť prietoku v prietokovom systéme nesmie brániť difúzii testovanej látky do receptorovej kvapaliny. V systéme statického difuzéra by sa kvapalina mala neustále miešať a mali by sa z nej pravidelne odoberať vzorky. Ak sa skúma metabolizmus, receptorová kvapalina musí podporovať životaschopnosť kože počas celého experimentu.

1.4.3. **Kožné preparáty**

Na prípravu kožného preparátu možno použiť kožu človeka alebo iných živočíchov. Je známe, že použitie ľudskej kože je predmetom vnútroštátnych a medzinárodných etických úvah a podmienok. Hoci sa uprednostňuje použitie živej kože, možno použiť neživú kožu za predpokladu, že je možné preukázať integritu kože. Prijateľné sú ako epidermálne membrány (oddelené enzymaticky, teplom alebo chemicky), tak aj koža rozdelená po hrúbke (zvyčajne v hrúbke 200 – 400 μm), získaná pomocou dermatómu. Možno použiť kožu v celej hrúbke, ale malo by sa zabrániť použitiu kože s nadmernou hrúbkou *(cca.* 1 mm), ak sa to osobitne nevyžaduje na stanovenie testovanej chemickej látky v jednotlivých vrstvách kože. Výber živočíšnych druhov, anatomického miesta a preparačnej techniky sa musí zdôvodniť. Vyžadujú sa prijateľné údaje z minimálne štyroch opakovaných vzoriek na jeden testovací preparát.

1.4.4. **Integrita kožného preparátu**

Je dôležité, aby koža bola vhodne pripravená. Nevhodná manipulácia môže viesť k poškodeniu rohovitej vrstvy kože *(stratum corneum)*, a preto sa musí skontrolovať integrita kožného preparátu. Pri skúmaní metabolizmu kože by sa mala použiť čerstvo vyrezaná koža čo najskôr a za podmienok, o ktorých sa vie, že podporujú metabolickú aktivitu. Všeobecne povedané, čerstvo vyrezaná koža by sa mala použiť v priebehu 24 hodín, ale prijateľná dĺžka času skladovania sa môže líšiť v závislosti od enzymatického systému podieľajúceho sa na metabolizme a od teploty skladovania (13). Ak sa pred použitím kožné preparáty skladujú, je potrebné dokázať, že bariérová funkcia sa zachovala.

1.4.5. **Testovaná látka**

Testovaná látka je látka, ktorej penetračné vlastnosti sa skúmajú. V ideálnom prípade je testovaná látka rádioaktívne označená.

1.4.6. **Testovaný prípravok**

Prípravok testovanej látky (napríklad čistý, zriedený alebo vytvorený materiál obsahujúci testovanú látku, ktorá sa aplikuje na kožu) by mal byť rovnaký (prípadne realisticky zástupný) ako prípravok, ktorému môže byť exponovaný človek alebo iný potenciálny živočíšny druh. Každú odchýlku od „používaného“ prípravku je potrebné zdôvodniť.

▼B

1.4.7. **Koncentrácie a zloženie testovaných látok**

Zvyčajne sa používa viac ako jedna koncentrácia testovanej látky obsahujúcej horný rozsah potenciálnych expozícií ľudí. Podobe by sa malo zvážiť testovanie rozsahu typických zložení.

1.4.8. **Aplikácia na kožu**

Pri bežných podmienkach expozície ľudí chemickým látkam sa obyčajne stretávame s konečnými dávkami. Z tohto dôvodu sa pri teste musí použiť aplikácia, ktorá napodobňuje expozíciu človeka, zvyčajne 1 – 5 mg/cm^2 pri tuhých látkach a maximálne 10 µl/cm^2 pri kvapalinách. Množstvo treba zdôvodniť očakávanými podmienkami použitia, cieľmi štúdie či fyzikálnymi charakteristikami testovacieho prípravku. Napríklad aplikácia na povrch kože môže byť nekonečná, ak sa aplikujú veľké množstvá na jednotku plochy.

1.4.9. **Teplota**

Teplota ovplyvňuje pasívnu difúziu chemikálií (a tým aj ich absorpciu kožou). Difúzna komora a koža by sa mali udržiavať pri konštantnej teplote blízko normálnej teploty kože 32 °C ± 1 °C. Pre rôzne vzhľadové riešenia difuzérov sa vyžadujú rôzne vodné kúpele či teploty nahrievacích blokov na zaistenie toho, že receptor/koža je vo svoje fyziologickej norme. Odporúčaná vlhkosť by mala byť v rozsahu medzi 30 a 70 %.

1.4.10. **Dĺžka trvania expozície a odber vzoriek**

Expozícia kože testovaciemu prípravku môže trvať počas celého experimentu alebo kratšie (t. j. na napodobnenie špecifického typu expozície človeka). Nadbytočné množstvo testovacieho prípravku sa musí z kože zmyť pomocou vhodného čistiaceho prostriedku a opláchnutá tekutina sa pozbiera na analýzu. Postup odstránenia testovacieho prípravku z kože bude závisieť od očakávaných podmienok použitia a treba ho zdôvodniť. Zvyčajne sa vyžaduje odber vzoriek každých 24 hodín, aby sa umožnila adekvátna charakterizácia absorpčného profilu. Keďže integrita kože sa môže začať po 24 hodinách narušovať, čas odberu vzoriek by zvyčajne nemal presiahnuť 24 hodín. Pri testovaných látkach, ktoré rýchlo prenikajú kožou, to nemusí byť potrebné, ale dlhší časový úsek odberu vzoriek môže byť potrebný v prípade látok, ktoré prenikajú kožou pomaly. Frekvencia odberu vzoriek receptorovej kvapaliny by mala umožniť grafické vyjadrenie absorpčného profilu testovanej látky.

1.4.11. **Záverečné postupy**

Všetky zložky testovacieho systému sa musia analyzovať, pričom je potrebné stanoviť výťažnosť. To zahŕňa donorovú komoru, oplachovanie povrchu kože, kožný preparát a receptorovú kvapalinu/komoru. V niektorých prípadoch možno kožu rozdeliť na exponovanú oblasť kože a na oblasť kože pod prírubou difuzéra a na *stratum corneum,* epidermu a dermu na účely osobitnej analýzy.

1.4.12. **Analýza**

Vo všetkých štúdiách je potrebné dosiahnuť adekvátnu výťažnosť (cieľom by malo byť priemerne 100 – 10 % rádioaktivity, pričom všetky odchýlky je potrebné zdôvodniť). Pomocou vhodnej techniky sa analyzuje množstvo testovanej látky v receptorovej kvapaline, kožnom preparáte, tekutine, s ktorou sa opláchla koža, a všetky použité pomôcky.

▼B

2. **ÚDAJE**

Je potrebné zaznamenať analýzu receptorovej kvapaliny, distribúcie testovanej chemickej látky v testovacom systéme a absorpčného profilu látky v čase. Pri použití podmienok konečnej dávky expozície by sa malo vypočítať množstvo látky opláchnutej z kože, množstvo asociované s kožou (a v jednotlivých vrstvách kože, ak sa analyzujú) a množstvo prítomné v receptorovej kvapaline (prietok a množstvo či percentuálny podiel aplikovanej dávky). Absorpcia kožou môže byť niekedy vyjadrená pomocou samotných údajov týkajúcich sa receptorovej kvapaliny. Ak však testovaná látka ostáva na konci štúdie v koži, možno ju bude potrebné zahrnúť do celkového absorbovaného množstva (pozri odsek 66 v odkaze na literatúru 3). Keď sa použijú podmienky konečnej dávky expozície, na základe údajov bude možné vypočítať konštantu priepustnosti (Kp). V tomto prípade nie je dôležitý percentuálny podiel absorbovanej látky.

3. **SPRÁVY**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí zahŕňať požiadavky stanovené v protokole vrátane zdôvodnenia použitého testovacieho systému a musí obsahovať tieto údaje:

Testovaná látka:

— fyzikálna povaha, fyzikálno-chemické vlastnosti (aspoň molekulová hmotnosť a pod. a log P_{ow}), čistota (rádiochemická čistota),

— identifikačné údaje (napr. číslo šarže),

— rozpustnosť v receptorovej kvapaline.

Testovací prípravok:

— zloženie a zdôvodnenie použitia,

— homogenita.

Testovacie podmienky:

— zdroje a anatomické miesto odberu kože, spôsob prípravy, podmienky skladovania pred použitím, predchádzajúca expozícia (čistiace látky, antibiotické ošetrenia a pod.), meranie integrity kože, metabolický stav, zdôvodnenie použitia,

— konštrukčné riešenie difuzéra, zloženie receptorovej kvapaliny, rýchlosť prietoku receptorovej kvapaliny či intervaly a postupy odberu vzoriek,

— podrobnosti o aplikácii testovacieho prípravku a kvantifikácia aplikovanej dávky,

— dĺžka expozície,

— podrobnosti o odstraňovaní testovacieho prípravku z kože, napr. oplachovanie kože,

— podrobnosti o analýze kože a všetkých frakčných technikách použitých na preukázanie distribúcie látky v koži,

▼B

— postupy umývania difuzéra a zariadenia,

— testovacie metódy, extrakčné techniky, limity detekcie a validácia analytickej metódy.

Výsledky

— celková výťažnosť experimentu (aplikovaná dávka = opláchnutie z kože + koža + receptorová kvapalina + opláchnutia difuzéra),

— zaznamenanie jednotlivých hodnôt výťažnosti z každého oddelenia difuzéra do tabuľky,

— absorpčný profil,

— zaznamenanie údajov o absorpcii do tabuľky (vyjadrené ako rýchlosť, množstvo či percentuálny podiel).

Rozbor výsledkov

Záver

4. **ODKAZY NA LITERATÚRU**

(1) Testing Method B.44. Skin Absorption: *In vivo* Method.

(2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

(3) OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

(4) Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

(5) Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications,* RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237 – 241.

(6) Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications.* CRC Press, Boca Raton.

(7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

(8) Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, 191 – 205.

(9) Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

(10) Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et al.* (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

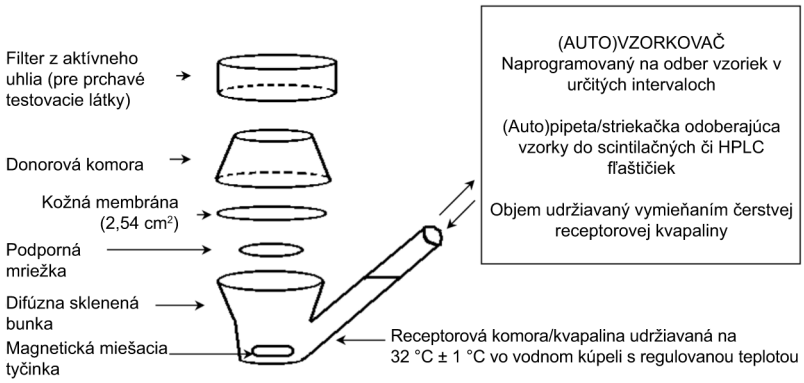
(11) Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

(12) Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

(13) Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356 – 365.

Obrázok 1

Príklad typického riešenia statického difuzéra používaného pri štúdiách perkutánnej absorpcie *in vitro*



▼M8

B.46. PODRÁŽDENIE KOŽE *IN VITRO*: TEST NA MODELI REKONŠTRUOVANEJ ĽUDSKEJ POKOŽKY

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda (TM) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 439 (2015). Podráždenie kože je vznik vratného poškodenia kože po aplikácii testovanej chemikálie v trvaní do 4 hodín [v znení definície podľa Globálneho harmonizovaného systému klasifikácie a označovania chemických látok (GHS) Organizácie Spojených národov (OSN) (1) a nariadenia Európskej únie (EÚ) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (CLP) ([1])]. Touto testovacou metódou sa zabezpečuje postup *in vitro*, ktorý možno použiť na identifikáciu nebezpečnosti dráždivých chemikálií (látok a zmesí) v súlade s kategóriou 2 GHS OSN a CLP (2). V regiónoch, ktoré neprijali nepovinnú kategóriu 3 GHS OSN (látky spôsobujúce mierne podráždenie), túto testovaciu metódu možno použiť aj na identifikáciu chemikálií, ktoré nie sú klasifikované. Táto testovacia metóda sa preto smie v závislosti od regulačného rámca a používaného klasifikačného systému použiť na určenie podráždenia kože chemikáliami buď ako nezávislý test, ktorý slúži ako náhrada za testy podráždenia kože *in vivo*, alebo ako čiastočný náhradný test v rámci stratégie testovania (3).

2. Posudzovanie podráždenia kože zvyčajne zahŕňalo použitie laboratórnych zvierat [TM B.4, rovnocenná s OECD TG 404, pôvodne prijatá v roku 1981 a revidovaná v rokoch 1992, 2002 a 2015] (4). Na testovanie žieravosti sa prijali tri validované testovacie metódy *in vitro* – ako EÚ TM B.40 (rovnocenná s OECD TG 430), TM B.40a (rovnocenná s OECD TG 431) a TM B.65 (rovnocenná s OECD TG 435) (5) (6) (7). V usmerňovacom dokumente OECD o integrovaných prístupoch k testovaniu a hodnoteniu (IATA) v prípade poleptania a podráždenia kože sa opisuje viacero modulov, v ktorých sú zoskupené zdroje informácií a analytické nástroje, a poskytuje sa usmernenie o tom, i) ako integrovať a využívať existujúce údaje z testovania, ako aj údaje nepochádzajúce z testovania na posúdenie žieravých a dráždivých vlastností chemikálií pre kožu, a ii) navrhuje sa v ňom prístup v prípade potreby ďalšieho testovania (3).

3. Táto testovacia metóda sa týka podráždenia kože ako sledovaného parametra ľudského zdravia. Je založená na systéme *in vitro* testovania rekonštruovanej ľudskej pokožky (RhE), ktorý dôkladne napodobňuje biochemické a fyziologické vlastnosti vrchnej časti ľudskej kože, t. j. pokožky. Systém testovania RhE používa netransformované ľudské keratinocyty získané z ľudskej pokožky ako bunkový zdroj na rekonštrukciu modelu pokožky s reprezentatívnou histológiou a cytoarchitektúrou. Výkonnostné normy (PS) sú k dispozícii na umožnenie validácie a posudzovania podobných a upravených testovacích metód založených na modeli rekonštruovanej ľudskej pokožky (RhE) v súlade so zásadami usmerňujúceho dokumentu OECD č. 34 (8) (9). Príslušné usmernenie na vykonávanie testov sa pôvodne prijalo v roku 2010, pričom v roku 2013 sa aktualizovalo s cieľom začleniť dodatočné modely RhE, a v roku 2015 sa aktualizovalo s cieľom odkázať na usmerňovací dokument IATA a zaviesť používanie alternatívneho postupu na meranie životaschopnosti.

4. V prípade štyroch komerčne dostupných modelov testovania *in vitro* (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28), ktoré sú založené na systéme testovania RhE, sa ukončili predvalidačné, optimalizačné a validačné štúdie (citlivosť 80 %, špecifickosť 70 %, a presnosť 75 %). Tieto štyri modely sú zahrnuté v tejto TM

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006 (Ú. v. EÚ L 353/1, 31.12.2008).

▼M8

a sú uvedené v dodatku 2, kde sa uvádzajú aj informácie o type validačnej štúdie použitej na validovanie príslušných testovacích metód. Ako sa uvádza v dodatku 2, na vývoj súčasnej testovacej metódy a výkonnostných noriem (8) sa použila validovaná referenčná metóda (VRM).

5. Vzájomné uznávanie údajov podľa dohody OECD bude možné zaručiť len v prípade modelov testovania validovaných podľa výkonnostných noriem (8), ak tieto modely testovania preskúmala a prijala organizácia OECD. Modely testovania zaradené do tejto testovacej metódy a do príslušného TG OECD možno bez rozlišovania využívať na riešenie požiadaviek krajín, ktoré sa týkajú výsledkov testov v súvislosti s metódami testovania podráždenia kože *in vitro*, a to pri súčasnom využívaní prínosov plynúcich zo vzájomného uznávania údajov.

6. Vymedzenie pojmov použitých v tomto dokumente sa uvádza v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

7. Ako sa preukazuje v úplnej výhľadovej validačnej štúdii posudzujúcej a opisujúcej testovacie metódy RhE (16), obmedzením danej testovacej metódy je, že neumožňuje klasifikáciu chemikálií do nepovinnej kategórie 3 (látky spôsobujúce mierne podráždenie) v zmysle GHS OSN (1). Preto sa o spôsobe používania tejto testovacej metódy rozhodne prostredníctvom regulačného rámca v členských krajinách. V prípade EÚ sa v CLP nezohľadnila kategória 3. Na úplné vyhodnotenie lokálnych účinkov na kožu po jednorazovej expozícii kože by sa mal použiť usmerňovací dokument OECD o integrovaných prístupoch k testovaniu a hodnoteniu (3). Je známe, že použitie ľudskej kože podlieha vnútroštátnym a medzinárodným etickým zásadám a podmienkam.

8. Táto testovacia metóda sa týka podráždenia kože ako sledovaného parametra ľudského zdravia. Hoci táto testovacia metóda neposkytuje dostatok informácií o poleptaní kože, treba poznamenať, že TM B.40a (ekvivalentná s OECD TG 431) týkajúca sa poleptania kože je založená na tom istom systéme testovania na modeli RhE, aj keď sa pri nej používa iný protokol (6). Táto testovacia metóda je založená na modeloch RhE a využívajú sa pri nej ľudské keratinocyty, ktoré preto predstavujú *in vitro* cieľový orgán druhu, ktorý je predmetom záujmu. Okrem toho sa priamo vzťahuje na počiatočný krok zápalovej kaskády/akčného mechanizmu (poškodenie buniek a tkanív vedúce k lokálnej traume), ku ktorým dochádza počas podráždenia *in vivo*. V rámci validácie, ktoré je základom tejto testovacej metódy, bol otestovaný celý rad chemikálií, a databáza validačnej štúdie obsahuje celkovo 58 chemikálií (16) (18) (23). Táto testovacia metóda je uplatniteľná pre tuhé látky, kvapaliny, polotuhé látky a vosky. Kvapaliny môžu byť vodné alebo nevodné; tuhé látky môžu byť rozpustné alebo nerozpustné vo vode. Tuhé materiály by sa mali podľa možnosti pred aplikáciou zomlieť na jemný prášok; žiadne iné predchádzajúce ošetrenie vzorky sa nevyžaduje. Plyny a aerosóly ešte neboli vo validačnej štúdii posúdené (29). Aj keď je možné, že tieto látky sa môžu testovať použitím technológie RhE, aktuálna testovacia metóda neumožňuje testovanie plynov a aerosólov.

9. Pred použitím danej testovacej metódy na zmesi s cieľom generovať údaje plánované na regulačné účely by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na daný účel, a ak áno, tak prečo. Takéto úvahy nie sú potrebné, ak existuje regulačná požiadavka na testovanie danej zmesi. Vzhľadom na skutočnosť, že zmesi zahŕňajú široké spektrum kategórií a zloženia, a na skutočnosť, že v súčasnosti sú dostupné iba obmedzené informácie o testovaní zmesí, by sa však v prípadoch, keď možno preukázať nepoužiteľnosť testovacej metódy pri špecifickej kategórii zmesí (napr. na základe stratégie navrhovanej Eskesom *et al.*, 2012) (30), daná testovacia metóda nemala používať pri uvedenej špecifickej kategórii zmesí. Podobne

▼**M8**

opatrne by sa malo postupovať v prípade, ak sa zistí, že špecifické chemické triedy alebo fyzikálno-chemické vlastnosti nie sú uplatniteľné na aktuálnu testovaciu metódu.

10. Testované chemikálie absorbujúce svetlo v rovnakom rozsahu ako formazán MTT a testované chemikálie so schopnosťou priamo redukovať vitálne farbivo MTT (na formazán MTT) môžu interferovať s výsledkami merania životaschopnosti buniek a môžu si vyžadovať použitie prispôsobených kontrol korekcie (pozri odseky 28 – 34).

11. Jeden testovací cyklus, ktorý sa skladá z troch replikátov tkaniva, by mal pri testovanej chemikálii postačovať, ak je jej klasifikácia jednoznačná. V prípadoch s hraničnými výsledkami, napríklad ak sa nezhodujú merania replikátov/alebo ak sa stredný percentuálny podiel životaschopnosti rovná 50 ±5 %, je však potrebné zvážiť vykonanie druhého testovacieho cyklu, ako aj tretieho testovacieho cyklu, ak sa výsledky z prvých dvoch testovacích cyklov nezhodujú.

PRINCÍP TESTU

12. Testovaná chemikália sa lokálne aplikuje na trojrozmerný model RhE pozostávajúci z netransformovaných keratinocytov získaných z ľudskej pokožky, ktoré sa vykultivovali tak, aby vytvorili viacvrstvový, vysoko diferencovaný model ľudskej pokožky. Pozostáva z organizovanej bazálnej vrstvy, vrstvy ostnitých buniek a vrstvy zrnitých buniek a viacvrstvovej rohovitej vrstvy (*stratum corneum*) obsahujúcej medzibunkové lipidové lamelové vrstvy predstavujúce hlavné triedy lipidov, ktoré sú analogické vrstvám nachádzajúcim sa *in vivo*.

13. Podráždenie kože vyvolané chemikáliou, ktoré sa prejavuje hlavne erytémom a edémom, je výsledkom kaskády udalostí, ktoré sa začínajú prienikom chemikálií do *stratum corneum*, kde môžu poškodiť hlbšie ležiace vrstvy keratinocytov a ďalších kožných buniek. Poškodené bunky môžu buď uvoľniť zápalové mediátory alebo spustiť zápalovú kaskádu, ktorá takisto pôsobí na bunky v koži, najmä na stromálne a endotelové bunky a krvné cievy. Dilatácia a zvýšená permeabilita endotelových buniek spôsobuje príznaky erytému a edému (29). Ak sa v systéme testovania *in vitro* nevyskytne žiadna vaskularizácia, metódami testovania na základe RhE sa predovšetkým meria spustenie javov v ich postupnosti, napr. poškodenie buniek/tkaniva (16) (17), pričom sa ako výstup použije životaschopnosť buniek.

14. Životaschopnosť buniek sa meria enzymatickou premenou vitálneho farbiva MTT [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium-bromid, tiazolylová modrá; CAS číslo 298-93-1] na modrú formazánovú soľ, ktorá sa kvantitatívne meria po extrakcii z tkanív (31). Dráždivé chemikálie sa identifikujú na základe ich schopnosti spôsobiť pokles životaschopnosti buniek pod vymedzené prahové úrovne (t. j. ≤ 50 % pre kategóriu 2 GHS OSN/CLP). V závislosti od regulačného rámca a uplatniteľnosti testovacej metódy sa môžu testované chemikálie, ktoré spôsobujú zvýšenie životaschopnosti buniek nad vymedzenú prahovú úroveň, považovať za nedráždivé látky (t. j. > 50 %, bez kategórie).

▼**M8**

PREUKAZOVANIE SPÔSOBILOSTI

15. Pred bežným použitím ktoréhokoľvek zo štyroch validovaných testovacích modelov, ktoré zodpovedajú požiadavkám tejto testovacej metódy (dodatok 2), by mali laboratóriá preukázať technickú spôsobilosť na základe použitia desiatich chemikálií na preukázanie spôsobilosti uvedených v tabuľke 1. V prípadoch, keď napríklad uvedená látka nie je k dispozícii, možno použiť inú látku, pri ktorej sú k dispozícii primerané referenčné údaje *in vivo* a *in vitro* [napríklad zo zoznamu referenčných chemikálií (8)], za predpokladu, že sa uplatnia rovnaké kritériá výberu, ktoré sú opísané v tabuľke 1. Použitie alternatívnej látky na preukázanie spôsobilosti by malo byť odôvodnené.

16. Ako súčasť testovania spôsobilosti sa odporúča, aby používatelia overili bariérové vlastnosti tkanív po ich prijatí, ako to stanovuje tvorca modelu RhE. To je osobitne dôležité najmä vtedy, ak sa tkanivá zasielajú na veľkú vzdialenosť alebo počas dlhých časových období. Po úspešnom stanovení testovacej metódy a po získaní a preukázaní spôsobilosti na jej použitie už takéto overovanie nebude bežne potrebné. Pri pravidelnom používaní testovacej metódy sa však odporúča naďalej v pravidelných intervaloch posudzovať bariérové vlastnosti.

Tabuľka 1

Látky na preukázanie spôsobilosti ([1])

Látka	Číslo CAS	*In vivo* hodnota ([2])	Fyzikálny stav	Kategória GHS OSN
NEKLASIFIKOVANÉ LÁTKY (zaradenie bez kategórie podľa GHS OSN)				
kyselina naftalénoctová	86-87-3	0	tuhá	bez kategórie
izopropanol	67-63-0	0,3	kvapalná	bez kategórie
metyl-stearát	112-61-8	1	tuhá	bez kategórie
heptyl-butyrát	5870-93-9	1,7	kvapalná	bez kategórie (*nepovinná kat. 3*) ([3])
hexyl-salicylát	6259-76-3	2	kvapalná	bez kategórie (*nepovinná kat. 3*) ([3])
KLASIFIKOVANÉ LÁTKY (kategória GHS OSN č. 2)				
3-p-kumenyl-2-metylpropanál	103-95-7	2,3	kvapalná	kat. 2
1-brómhexán	111-25-1	2,7	kvapalná	kat. 2
hydroxid draselný (5 % roztok)	1310-58-3	3	kvapalná	kat. 2
1-metyl-3-fenyl-1-piperazín	5271-27-2	3,3	tuhá	kat. 2
heptanál	111-71-7	3,4	kvapalná	kat. 2

([1]) Látky na preukázanie spôsobilosti sú podskupinou látok, ktoré sa používajú vo validačnej štúdii, a ich výber je založený na týchto kritériách: i) chemické látky sú komerčne dostupné; ii) zastupujú celý rad výsledkov dráždivosti Draizovho testu (od nedráždivých až po silne dráždivé); iii) majú dobre definovanú chemickú štruktúru; iv) sú reprezentatívne z hľadiska chemickej funkčnosti použitej v rámci validačného postupu; v) dosiahli sa nimi reprodukovateľné výsledky *in vitro* v rámci mnohonásobného testovania a v početných laboratóriách; vi) uskutočnila sa ich správna prognóza *in vitro* a vii) nie je s nimi spojený extrémne toxický profil (napr. karcinogénny alebo toxický pre reprodukčný systém) a nie sú s nimi spojené neúmerné náklady na zneškodnenie.

([2]) *In vivo* hodnotenie v súlade s TM B.4 (4).

([3]) V rámci tejto testovacej metódy sa nepovinná kategória 3 v zmysle GHS OSN (látky spôsobujúce mierne podráždenie) (1) považuje za zaradenie „bez kategórie“.

▼M8

POSTUP

17. Ďalej nasleduje opis zložiek a postupov testovacej metódy RhE na posúdenie podráždenia kože (pozri aj dodatok 3 v súvislosti s parametrami spojenými s každým modelom testovania). K dispozícii sú štandardné operačné postupy (SOP) pre dané štyri modely, ktoré sú v súlade s touto testovacou metódou (32) (33) (34) (35).

ZLOŽKY TESTOVACEJ METÓDY RHE

Všeobecné podmienky

18. Na rekonštrukciu epitelu by sa mali použiť netransformované ľudské keratinocyty. Pod funkčnou vrstvou *stratum corneum* by sa malo nachádzať viacero vrstiev životaschopných epitelových buniek (bazálna vrstva, *stratum spinosum, stratum granulosum*). Rohovitá vrstva *stratum corneum* by mala byť viacvrstvová a obsahovať potrebný lipidový profil, aby sa vytvorila silná funkčná bariéra, ktorá odolá rýchlemu prenikaniu cytotoxických referenčných chemikálií, ku ktorým patrí napríklad dodecylsulfát sodný (SDS) alebo Triton X-100. Mala by sa preukázať bariérová funkcia, ktorá sa môže posudzovať buď stanovením koncentrácie, pri ktorej referenčná chemikália znižuje životaschopnosť tkanív o 50 % (IC_{50}) po pevne stanovenom expozičnom čase, alebo stanovením expozičného času, ktorý je potrebný na zníženie životaschopnosti buniek o 50 % (ET_{50}) po aplikácii referenčnej chemikálie v určenej pevne stanovenej koncentrácii. Izolačné vlastnosti modelu RhE by mali zabrániť prieniku materiálu okolo *stratum corneum* do životaschopného tkaniva, čo by viedlo k chybnému modelovaniu expozície kože. Model RhE by nemal byť kontaminovaný baktériami, vírusmi, mykoplazmami ani hubami.

Funkčné podmienky

Životaschopnosť

19. Skúška použitá na kvantifikovanie životaschopnosti je skúška MTT (31). Životaschopné bunky RhE modelu tkaniva môžu redukovať vitálne farbivo MTT na vyzrážaný modrý formazánový produkt MTT, ktorý sa potom z tkaniva extrahuje pomocou izopropanolu (alebo podobného rozpúšťadla). Optická hustota (OD) samotného extrakčného rozpúšťadla by mala byť dostatočne nízka, t. j. OD < 0,1. Extrahovaný formazán MTT môže byť kvantifikovaný buď meraním absorbancie štandardu (OD) alebo spektrofotometriou HPLC/UPLC (36). Používatelia modelu RhE by sa mali ubezpečiť, že každá šarža použitého modelu RhE spĺňa kritériá stanovené pre negatívnu kontrolu. Rozsah prijateľnosti (hornú a dolnú hranicu) pre hodnoty optickej hustoty negatívnej kontroly (v podmienkach testovacej metódy kožnej dráždivosti) stanovuje autor/dodávateľ modelu RhE. V tabuľke 2 sú uvedené rozsahy prijateľnosti v prípade štyroch validovaných modelov RhE zahrnutých v tejto testovacej metóde. Používateľ spektrofotometrie HPLC/UPLC by mal pri negatívnej kontrole ako akceptačné kritérium použiť rozsahy optickej hustoty pri negatívnej kontrole stanovené v tabuľke 2. Malo by sa zaznamenať, že tkanivá ošetrené negatívnou kontrolou sú počas času expozície testu v kultúre stabilné (zabezpečujú podobné výsledky merania životaschopnosti).

Tabuľka 2

Rozsahy prijateľnosti pre hodnoty optickej hustoty pri negatívnej kontrole v prípade testovacích modelov zahrnutých v tejto TM

	Dolná hranica prijateľnosti	Horná hranica prijateľnosti
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8

▼**M8**

	Dolná hranica prijateľnosti	Horná hranica prijateľnosti
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Bariérová funkcia

20. Vrstva *stratum corneum* a jej lipidové zloženie by mali byť dostačujúce na zabránenie rýchlemu prieniku cytotoxických referenčných chemikálií (napr. SDS alebo Triton X-100), a to podľa odhadu pomocou IC_{50} alebo ET_{50} (tabuľka 3).

Morfológia

21. Model RhE by sa mal histologicky preskúmať, aby sa preukázalo, že má štruktúru podobnú ľudskej pokožke (vrátane viacvrstvovej *stratum corneum*).

Reprodukovateľnosť

22. Výsledky pozitívnych a negatívnych kontrol danej testovacej metódy by mali preukázať reprodukovateľnosť v priebehu čase.

Kontrola kvality (QC)

23. Model RhE by sa mal používať len v prípade, ak autor/dodávateľ preukáže, že každá šarža použitého modelu RhE spĺňa stanovené kritériá na uvoľnenie do obehu, v rámci ktorých sú najvýznamnejšie kritériá *životaschopnosti* (odsek 19), *bariérovej funkcie* (odsek 20) a *morfológie* (odsek 21). Tieto údaje by sa mali poskytnúť používateľom testovacej metódy, aby mohli túto informáciu zahrnúť do správy o teste. Rozsah prijateľnosti (hornú a dolnú hranicu) pre IC_{50} alebo ET_{50} by mal stanoviť autor/dodávateľ modelu RhE. Na spoľahlivú prognózu klasifikácie podráždenia sú prijateľné len tie výsledky, ktoré sa získali z kvalifikovaných tkanív. V tabuľke 3 sú uvedené rozsahy prijateľnosti v prípade štyroch modelov zahrnutých v tejto TM.

Tabuľka 3

Kritériá kontroly kvality na uvoľnenie šarží do obehu v prípade testovacích modelov zahrnutých v tejto TM

	Dolná hranica prijateľnosti	Horná hranica prijateľnosti
EpiSkin™ (SM) (18-hodinové ošetrenie 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 hodiny	ET_{50} = 8,7 hodiny
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 hodiny	ET_{50} = 10,0 hodiny
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18-hodinové ošetrenie SDS) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

▼M8

Aplikácia testovaných chemikálií a kontrolných chemikálií

24. V každom testovacom cykle by sa mali použiť aspoň tri replikáty pri každej testovanej chemikálii a kontrolách. V prípade kvapalných aj tuhých chemikálií je potrebné na povrch pokožky rovnomerne naniesť dostatočné množstvo testovanej chemikálie, pričom je nutné vyhýbať sa nekonečnej dávke, t. j. v rozsahu od 26 do 83 µl/cm^2 alebo mg/cm^2 (pozri dodatok 3). V prípade tuhých chemikálií by sa mal pred aplikáciou povrch pokožky zvlhčiť deionizovanou alebo destilovanou vodou, aby sa tak zlepšil kontakt testovanej chemikálie s povrchom pokožky. Tuhé látky by sa mali podľa možnosti testovať vo forme jemného prášku. V niektorých prípadoch sa ako pomôcka na rozotrenie môže použiť nylonové sitko (pozri dodatok 3). Na konci expozičného času by sa testovaná chemikália mala dôkladne zmyť z povrchu pokožky tlmivým roztokom alebo 0,9 % roztokom NaCl. V závislosti od použitých testovacích modelov RhE sa čas expozície pohybuje v rozmedzí od 15 do 60 minút a inkubačná teplota v rozmedzí od 20 °C do 37 °C. Tieto expozičné časy a teploty sa optimalizujú pre každú jednotlivú testovaciu metódu RhE a vyjadrujú rôzne prirodzené vlastnosti testovacích modelov (napr. bariérová funkcia) (pozri dodatok 3).

25. V každom testovacom cykle by sa mala súbežne použiť negatívna kontrola (NC) a pozitívna kontrola (PC), aby sa preukázalo, že životaschopnosť (s použitím NC), bariérová funkcia a výsledná tkanivová citlivosť tkanív (s použitím PC) sa nachádzajú v rámci stanoveného historického rozsahu prijateľnosti. Navrhovanou chemikáliou na pozitívnu kontrolu je 5 % vodný dodecylsulfát sodný (SDS). Navrhovanými chemikáliami na negatívnu kontrolu je buď voda alebo fosfátom tlmený fyziologický roztok (PBS).

Merania bunkovej životaschopnosti

26. Podľa testovacieho postupu je dôležité, aby sa meranie životaschopnosti nevykonávalo ihneď po expozícii testovanej chemikálii, ale až po dostatočne dlhom inkubačnom čase po ošetrení opláchnutého tkaniva v čerstvom médiu. Tento čas umožňuje regeneráciu po slabých cytotoxických účinkoch, ako aj výskyt jasných cytotoxických účinkov. Počas testu optimalizácie dvoch testovacích modelov založených na RhE, z ktorých vychádza táto testovacia metóda (11) (12) (13) (14) (15), sa ako optimálny ukázal 42-hodinový inkubačný čas po ošetrení.

27. Skúška MTT je štandardizovaná kvantitatívna metóda, ktorá by sa mala používať na meranie životaschopnosti buniek v rámci tejto testovacej metódy. Je vhodná na použitie v trojrozmernom modeli tkaniva. Vzorka tkaniva sa na 3 hodiny vloží do roztoku MTT s vhodnou koncentráciou (napr. 0,3 – 1 mg/ml). MTT sa prostredníctvom životaschopných buniek premení na modrý formazán. Pomocou rozpúšťadla (napr. izopropanol, kyslý izopropanol) sa potom z tkaniva extrahuje vyzrážaný modrý formazánový produkt, pričom koncentrácia formazánu sa odmeria stanovením optickej hustoty pri 570 nm pomocou filtra pásma priepustnosti (pásmového filtra) s maximálnou odchýlkou ±30 nm alebo spektrofotometricky HPLC/UPLC (pozri odseky 34 a 36).

28. Optické vlastnosti testovanej chemikálie alebo jej chemický účinok na MTT (napr. chemikálie môžu zabraňovať procesu tvorby sfarbenia alebo ho zvrátiť, ale rovnako ho môžu aj spôsobovať) môžu interferovať so skúškou, čo vedie k nesprávnemu odhadu životaschopnosti. K tomu môže dôjsť, keď sa špecifická testovaná chemikália úplne neodstráni z tkaniva pri oplachovaní alebo keď prenikne cez pokožku. Ak testovaná chemikália pôsobí priamo na MTT (napr. redukcia MTT), je prirodzene sfarbená alebo sa sfarbí počas ošetrovania tkaniva, mali by sa použiť ďalšie kontroly, aby sa zistilo, či nedochádza k interferencii testovanej chemikálie s technikou

▼M8

merania životaschopnosti, a aby sa táto prípadná interferencia upravila (pozri odseky 29 a 33). Podrobný opis úpravy priamej redukcie MTT a interferencií farebnými činidlami sa nachádza v štandardných pracovných postupoch (SOP) v prípade štyroch validovaných modelov zahrnutých v tejto testovacej metóde (32) (33) (34) (35).

29. Na určenie priamych reduktantov MTT by sa mala každá testovaná chemikália pridať do čerstvo pripraveného roztoku MTT. Ak sa zmes MTT obsahujúca testovanú chemikáliu sfarbí do modra/purpurova, predpokladá sa, že daná testovaná chemikália priamo redukuje MTT, a mala by sa vykonať ďalšia funkčná kontrola neživotaschopných tkanív RhE, a to nezávisle od použitia merania absorbancie štandardu (OD) alebo spektrofotometrie HPLC/UPLC. Pri tejto dodatočnej funkčnej kontrole sa využívajú usmrtené tkanivá, ktoré sa vyznačujú len reziduálnou metabolickou aktivitou, ale absorbujú testovanú chemikáliu podobným spôsobom ako životaschopné tkanivá. Každá testovaná chemikália redukujúca MTT sa aplikuje najmenej na dva replikáty usmrteného tkaniva, ktoré sa podrobujú celému postupu testovania s cieľom vygenerovať nešpecifickú redukciu MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Na každú testovanú chemikáliu postačuje jediná kontrola NSMTT, a to bez ohľadu na počet vykonaných nezávislých testov/testovacích cyklov. Skutočná životaschopnosť tkaniva sa potom vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaný zo živých tkanív vystavených chemikálii redukujúcej MTT mínus percentuálny podiel nešpecifickej redukcie MTT získaný z usmrtených tkanív vystavených tej istej chemikálii redukujúcej MTT, počítané v porovnaní s testovacím cyklom negatívnej kontroly vykonávaným súbežne s upravovaným testom (% NSMTT).

30. S cieľom zistiť potenciálnu interferenciu sfarbenými testovanými chemikáliami alebo testovanými chemikáliami, ktoré sa sfarbili pri kontakte s vodou alebo izopropanolom, a aj s cieľom rozhodnúť o potrebe dodatočných kontrol by sa mala vykonať spektrálna analýza testovanej chemikálie vo vode (prostredie počas expozície) a/alebo v izopropanole (extrakčný roztok). Ak testovaná chemikália vo vode a/alebo izopropanole absorbuje svetlo v rozsahu 570 ±30 nm, mali by sa vykonať ďalšie kontroly s použitím farbiaceho činidla, alebo, ako alternatíva, by sa mal použiť postup spektrofotometrie HPLC/UPLC, a v tom prípade sa tieto kontroly nevyžadujú (pozri odseky 33 a 34). Pri vykonávaní merania absorbancie štandardu (OD) sa každá testovaná zafarbená chemikália, ktorá interferuje, aplikuje najmenej na dva životaschopné replikáty tkaniva, ktoré sa potom podrobia celému postupu testovania, ale počas kroku inkubácie MTT sa inkubujú s médiom namiesto inkubácie s roztokom MTT, a to s cieľom vygenerovať kontrolu nešpecifickej farby (NSC_{living}). Je potrebné, aby sa kontrola NSC_{living} vykonávala súbežne s testovaním zafarbenej testovanej chemikálie, a v prípade mnohonásobného testovania je potrebné vykonať nezávislú kontrolu NSC_{living} pri každom vykonanom teste (v každom testovacom cykle) z dôvodu inherentnej biologickej variability živých tkanív. Skutočná životaschopnosť tkaniva sa potom vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaného zo živých tkanív vystavených interferujúcej testovanej chemikálii a inkubovaných s roztokom MTT mínus percentuálny podiel nešpecifickej farby získanej zo živých tkanív, ktoré boli vystavené interferujúcej testovanej chemikálii a inkubované s médiom bez MTT, čo sa vykonáva súbežne s upravovaným testom(% NSC_{living}).

31. V prípade testovaných chemikálií, ktoré sú identifikované ako chemikálie produkujúce tak priamu redukciu MTT (pozri odsek 29), ako aj farebnú interferenciu (pozri odsek 30), sa bude pri vykonávaní merania absorbancie štandardu (OD) takisto vyžadovať tretí súbor kontrol, a to popri kontrolách NSMTT a NSC_{living}, ktoré sú opísané v predchádzajúcich odsekoch. Býva to tak zvyčajne v prípade tmavo sfarbených testovaných chemikálií, ktoré interferujú so skúškou MTT (napr. modré,

▼M8

purpurové, čierne), pretože ich prirodzená farba bráni hodnoteniu ich kapacity priamo redukovať MTT, ako sa opisuje v odseku 29. Tieto testované chemikálie sa môžu viazať tak na živé, ako aj na usmrtené tkanivá, a preto kontrola NSMTT môže nielen korigovať potenciálnu priamu redukciu MTT testovanou chemikáliou, ale aj farebnú interferenciu, ktorá vyplýva z väzby testovanej chemikálie na usmrtené tkanivá. To by mohlo viesť k dvojitej korekcii farebnej interferencie, keďže kontrola NSC_{living} už koriguje farebnú interferenciu vyplývajúcu z väzby testovanej chemikálie na živé tkanivá. S cieľom vyhnúť sa dvojitej korekcii pri farebnej interferencii je potrebné vykonať tretiu kontrolu pre nešpecifickú farbu v usmrtených tkanivách (NSC_{killed}). V tejto dodatočnej kontrole sa testovaná chemikália aplikuje najmenej na dva replikáty usmrteného tkaniva, ktoré sa podrobia celému postupu testovania, ale počas kroku inkubácie MTT sa inkubujú s médiom, a nie s roztokom MTT. Na každú testovanú chemikáliu postačuje jediná kontrola NSC_{killed}, a to bez ohľadu na počet vykonaných nezávislých testov/testovacích cyklov, ale mala by sa vykonať súbežne s kontrolou NSMTT, a ak je to možné, s tou istou šaržou tkaniva. Skutočná životaschopnosť tkaniva sa potom vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaného zo živých tkanív, ktoré boli vystavené testovanej chemikálii, mínus % NSMTT mínus % NSC_{living} plus percentuálny podiel nešpecifickej farby získanej z usmrtených tkanív, ktoré boli vystavené interferujúcej testovanej chemikálii a inkubované s médiom bez MTT, počítané vo vzťahu k negatívnej kontrole, čo sa vykonáva súbežne s upravovaným testom (% NSC_{killed}).

32. Je dôležité poznamenať, že nešpecifická redukcia MTT a nešpecifické farebné interferencie môžu mať za následok zvýšenie hodnôt tkanivového extraktu nad rozsah linearity spektrofotometra. Na tomto základe by malo každé laboratórium pred začatím testovania testovanej chemikálie na regulačné účely určiť rozsah linearity svojho spektrofotometra s formazánom MTT (CAS č. 57360-69-7) z komerčného zdroja. Meranie absorbancie štandardu (OD) s použitím spektrofotometra je vhodné na posúdenie chemikálií priamo redukujúcich MTT a farebne interferujúcich testovaných chemikálií, keď sa optické hustoty tkanivových extraktov, získaných s testovanou chemikáliou bez akejkoľvek korekcie v prípade priamej redukcie MTT a/alebo farebnej interferencie, nachádzajú v rámci rozsahu linearity spektrofotometra alebo keď nekorigovaný percentuálny podiel životaschopnosti získaný s testovanou chemikáliou je už $\leq$ 50 %. K výsledkom v prípade testovaných chemikálií produkujúcich % NSMTT a/alebo % $NSC_{living} \geq$ 50 % negatívnej kontroly by sa však malo pristupovať opatrne, keďže ide o prah používaný na odlíšenie klasifikovaných chemikálií od neklasifikovaných chemikálií (pozri odsek 36).

33. V prípade zafarbených testovaných chemikálií, ktoré nie sú kompatibilné s meraním absorbancie štandardu (OD) z dôvodu príliš silnej intereferencie so skúškou MTT, sa môže ako alternatíva na meranie formazánu MTT použiť postup spektrofotometrie HPLC/UPLC (pozri odseky 34 a 36). Systém spektrofotometrie HPLC/UPLC umožňuje oddelenie formazánu MTT od testovanej chemikálie pred jej kvantifikáciou (36). Z tohto dôvodu sa kontroly NSC_{living} alebo NSC_{killed} pri použití spektrofotometrie HPLC/UPLC nikdy nevyžadujú, nezávisle od chemikálie, ktorá sa testuje. Kontroly NSMTT by sa však predsa len mali použiť, ak existuje podozrenie, že testovaná chemikália priamo redukuje MTT alebo má farbu, ktorá bráni v hodnotení kapacity priamo redukovať MTT (ako sa opisuje v odseku 29). Pri použití spektrofotometrie HPLC/UPLC na meranie formazánu MTT sa percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva vypočíta ako percentuálny podiel plochy píku formazánu MTT, ktorý sa získa zo živých tkanív vystavených testovanej chemikálii, v porovnaní s píkom formazánu MTT získaným na základe súbežnej negatívnej kontroly. V prípade testovaných chemikálií, ktoré majú schopnosť priamo redukovať MTT, sa skutočná životaschopnosť tkaniva vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaný zo živých tkanív vystavených testovanej chemikálii

▼M8

mínus % NSMTT. Takisto je potrebné poznamenať, že chemikálie, ktoré priamo redukujú MTT, ktoré by takisto mohli farebne interferovať a ktoré po ošetrení zostávajú v tkanivách a redukujú MTT tak silno, že to má za následok optické hustoty (pri použití štandardného merania OD) alebo plochy píku (pri použití spektrofotometrie HPLC/UPLC) testovaných tkanivových extraktov, ktoré presahujú rozsah linearity spektrofotometra, takže ich nemožno hodnotiť, hoci tieto javy sa vyskytujú iba veľmi zriedkavo.

34. Spektrofotometria HPLC/UPLC sa môže takisto používať so všetkými typmi testovaných chemikálií (sfarbené, nesfarbené, reduktanty MTT a chemikálie neredukujúce MTT) na meranie formazánu MTT (36). Z dôvodu rozmanitosti systémov spektrofotometrie HPLC/UPLC by sa mala kvalifikácia systému spektrofotometrie HPLC/UPLC preukázať pred jeho použitím na kvantifikáciu formazánu MTT z tkanivových extraktov prostredníctvom splnenia kritérií prijateľnosti v prípade súboru štandardných parametrov kvalifikácie založených na parametroch opísaných v odvetvovom usmernení Amerického úradu pre potraviny a lieky (*U.S. Food and Drug Administration*) týkajúcom sa validácie bioanalytickej metódy (36)(37). Tieto kľúčové parametre a ich kritériá prijateľnosti sú uvedené v dodatku 4. Po splnení kritérií prijateľnosti vymedzených v dodatku 4 sa systém spektrofotometrie HPLC/UPLC považuje za kvalifikovaný a pripravený na meranie formazánu MTT za experimentálnych podmienok opísaných v tejto testovanej metóde.

Kritériá prijateľnosti

35. Pri každej testovacej metóde, pri ktorej sa používajú validované šarže modelu RhE (pozri odsek 23), by tkanivá ošetrené negatívnou kontrolou mali vykazovať optickú hustotu, ktorá odráža kvalitu tkanív po krokoch zaslania a prijatia a po všetkých postupoch podľa protokolu. Hodnoty optickej hustoty pri kontrole by nemali byť nižšie ako historicky stanovené hranice. Tkanivá ošetrené PC, t. j. 5 % vodným dodecylsulfátom sodným (SDS), by podobne mali odrážať svoju schopnosť reagovať na dráždivé chemikálie za podmienok testovacej metódy [pozri dodatok 3, a v prípade potreby ďalších informácií sú SOP pre štyri testovacie modely zahrnuté v tomto TG (32) (33) (34) (35)]. Súvisiace a vhodné opatrenia variability medzi replikátmi tkaniva, t. j. štandardné odchýlky (SD), by mali spadať do hraníc prijateľnosti stanovených pre použitý testovací model (pozri dodatok 3).

Interpretácia výsledkov a prognostický model

36. Hodnoty optickej hustoty zaznamenané pri každej testovanej chemikálii sa môžu použiť na výpočet percentuálneho podielu životaschopnosti normalizovanej na negatívnu kontrolu, ktorá je stanovená na 100 %. V prípade použitia spektrofotometrie HPLC/UPLC sa percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva vypočíta ako percentuálny podiel plochy píku formazánu MTT, ktorý sa získa zo živých tkanív vystavených testovanej chemikálii, v porovnaní s píkom formazánu MTT získaným na základe súbežnej negatívnej kontroly. Je potrebné jasne definovať, zdokumentovať a preukázať hraničnú percentuálnu hodnotu životaschopnosti buniek, ktorá rozlišuje medzi dráždivými testovanými chemikáliami a neklasifikovanými testovanými chemikáliami, a štatistický(-é) postup(-y) použitý(-é) pri hodnotení výsledkov a identifikácii dráždivých chemikálií (informácie sú uvedené v SOP v prípade testovacích modelov). Hraničné hodnoty prognózy podráždenia sú uvedené ďalej v texte:

▼M8

— Testovaná chemikália sa identifikuje ako chemikália, ktorá si vyžaduje klasifikáciu a označenie v súlade s GHS OSN/CLP (kategória 2 alebo kategória 1), ak je stredný percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva po expozícii a inkubácii po ošetrení menší alebo sa rovná (≤) 50 %. Keďže testovacie modely RhE, na ktoré sa vzťahuje táto testovacia metóda, neumožňujú rozlišovanie medzi kategóriami 1 a 2 podľa GHS OSN/CLP, na prijatie rozhodnutia o konečnej klasifikácii sa budú vyžadovať ďalšie informácie o poleptaní kože [pozri aj usmerňovací dokument OECD týkajúci sa IATA (3)]. V prípade zistenia, že testovaná chemikália je nežieravá (napr. na základe TM.40, B.40a alebo B.65) a vykazuje životaschopnosť tkaniva po expozícii a inkubácii po ošetrení, ktorá je nižšia alebo sa rovná (≤) 50 %, sa testovaná chemikália pokladá za dráždivú pre kožu v súlade s kategóriou 2 GHS OSN/CLP.

— V závislosti od regulačného rámca v členských krajinách možno testovanú chemikáliu považovať za nedráždivú pre kožu v súlade so zaradením „bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP, ak je životaschopnosť tkaniva po expozícii a inkubácii po ošetrení vyššia ako (>) 50 %.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje

37. Pri každom testovacom cykle je potrebné vo forme tabuľky zaznamenať údaje z jednotlivých replikátov tkanív (napr. hodnoty optickej hustoty a vypočítaný percentuálny podiel životaschopnosti buniek pre každú testovanú chemikáliu vrátane klasifikácie) vrátane údajov o opakovaných pokusoch, ak je to vhodné. Okrem toho by sa mali pri každom testovacom cykle uvádzať aj stredné hodnoty ± štandardnej odchýlky (SD). Pozorované interakcie s reakčným činidlom MTT a zafarbenými testovanými chemikáliami by sa mali oznamovať pre každú testovanú chemikáliu.

Správa o teste

38. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testované chemikálie a kontrolné chemikálie:

— jednozložková látka: identifikácia chemikálie, napr. názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak je to vhodné a prakticky uskutočniteľné atď.,

— viaczložková látka, UVCB a zmes: charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— zdroj, číslo dávky, ak je k dispozícii,

— prípadná úprava testovanej chemikálie/kontrolnej chemikálie pred testovaním (napr. zahrievanie, drvenie),

— stabilita testovanej chemikálie, konečný dátum použitia alebo dátum opätovnej analýzy, ak je známy,

— podmienky skladovania.

Použitý model RhE a protokol (a odôvodnenie danej voľby, ak je to uplatniteľné)

▼**M8**

Podmienky testovania:

— použitý model RhE (vrátane čísla šarže),

— údaje o kalibrácii zariadenia na meranie (napr. spektrofotometer), vlnová dĺžka a pásmový filter (ak je to uplatniteľné) použitý na kvantifikáciu formazánu MTT, a rozsah linearity zariadenia na meranie, opis metódy použitej na kvantifikáciu formazánu MTT,

— opis kvalifikácie systému spektrofotometrie HPLC/UPLC, ak je to uplatniteľné, úplné podporné údaje o konkrétnom použitom modeli RhE vrátane jeho výkonnosti. K nim by mali patriť okrem iného:

i) životaschopnosť;

ii) bariérová funkcia;

iii) morfológia;

iv) reprodukovateľnosť a predvídateľnosť;

v) kontroly kvality modelu (QC),

— odkaz na historické údaje o modeli. Mala by sem okrem iného patriť prijateľnosť údajov o kontrole kvality s odkazom na historické údaje o šaržiach.

— preukázanie spôsobilosti vykonávať testovaciu metódu pred bežným použitím prostredníctvom testovania chemikálií na preukázanie spôsobilosti.

Testovací postup:

— podrobné údaje o použitom testovacom postupe (vrátane postupov umývania použitých po expozičnom období); dávka testovanej chemikálie a použitých kontrol,

— trvanie expozičného času a inkubačného času po expozícii a teplota počas nich,

— indikácia kontrol použitých v prípade priamych reduktantov MTT a/alebo sfarbených testovaných chemikálií, ak je to uplatniteľné,

— počet replikátov tkaniva použitých pri každej z testovaných chemikálií a kontrol (PC, negatívna kontrola a NSMTT, NSC_{living} a NSC_{killed}, ak je to uplatniteľné),

— opis rozhodovacích kritérií/prognostického modelu, ktoré sa uplatňujú vzhľadom na použitý model RhE,

— opis všetkých modifikácií testovacieho postupu (vrátane postupov umývania).

Testovací cyklus a kritériá prijateľnosti testu

— pozitívnu a negatívnu kontrolu predstavujú stredné hodnoty a rozsahy prijateľnosti založené na historických údajoch, prijateľná variabilita medzi replikátmi tkaniva v prípade pozitívnych a negatívnych kontrol,

▼M8

— prijateľná variabilita medzi replikátmi tkaniva v prípade testovanej chemikálie.

Výsledky:

— tabuľkový zápis údajov týkajúcich sa jednotlivých testovaných chemikálií pri každom testovacom cykle a každom meraní replikátu, a to vrátane optickej hustoty alebo plochy píku formazánu MTT, percentuálneho podielu životaschopnosti tkaniva, stredného percentuálneho podielu životaschopnosti tkaniva a SD,

— ak je to uplatniteľné, výsledky kontrol použitých v prípade chemikálií priamo redukujúcich MTT a/alebo zafarbených testovaných chemikálií vrátane optickej hustoty alebo plochy píku formazánu MTT, % NSMTT, % NSC_{living}, % NSC_{killed}, SD, konečného správneho percentuálneho podielu životaschopnosti tkaniva,

— výsledky získané s testovanou(-ými) chemikáliou(-ami) a kontrolami vo vzťahu k definovanému testovaciemu cyklu a kritériám prijateľnosti testu,

— opis ďalších pozorovaných účinkov,

— odvodená klasifikácia v súvislosti s prognostickým modelom/rozhodovacími kritériami, ktoré sa používajú.

Rozbor výsledkov

Závery

LITERATÚRA

(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) Kapitola B.4 tejto prílohy, Akútne podráždenie, poleptanie kože.

(5) Kapitola B.40 tejto prílohy, Poleptanie kože *in vitro*: Testovacia metóda pomocou transkutánneho elektrického odporu (TER).

(6) Kapitola B.40a tejto prílohy, Poleptanie kože *in vitro*: Testovacia metóda s použitím rekonštruovanej ľudskej pokožky (RHE).

(7) Kapitola B.65 tejto prílohy, Metóda na testovanie s využitím membránovej bariéry *in vitro*.

▼**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). Smernica Komisie 2001/59/EC zo 6. augusta 2001, ktorou sa po 28-krát prispôsobuje technickému pokroku smernica Rady 67/548/EHS o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení týkajúcich sa klasifikácie, balenia a označenia nebezpečných látok, Úradný vestník Európskej únie L 225, s. 1-333.

▼M8

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o mieru výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom zhoda a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (9).

Životaschopnosť buniek: parameter na meranie celkovej aktivity bunkovej populácie, ako napríklad schopnosť bunkových mitochondriálnych dehydrogenáz redukovať vitálne farbivo MTT [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium bromid, tiazolylová modrá)], ktorý v závislosti od meraného sledovaného parametra a od použitej koncepcie testu zodpovedá celkovému počtu a/alebo vitalite živých buniek.

Chemikália: je látka alebo zmes.

Zhoda: ide o mieru výkonnosti pre testovacie modely, ktoré poskytujú kategorizačné výsledky, a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa niekedy používa zameniteľne s pojmom presnosť a je vymedzený ako podiel všetkých testovaných chemikálií, ktoré sú správne klasifikované ako pozitívne alebo negatívne. Zhoda je vo veľkej miere závislá od prevalencie pozitívnych výsledkov v typoch skúmaných testovaných chemikálií (9).

ET_{50}: môže sa odhadnúť stanovením expozičného času potrebného na zníženie životaschopnosti buniek o 50 % pri použití referenčnej chemikálie v špecifickej pevne určenej koncentrácii, pozri takisto IC_{50}.

GHS [Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií Organizácie Spojených národov (OSN)]: systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálnej, zdravotnej a environmentálnej nebezpečnosti a ich označovanie zodpovedajúcimi komunikačnými prvkami, ako sú piktogramy, výstražné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o nepriaznivých účinkoch daných chemikálií v záujme ochrany osôb (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a subjektov reakcie na núdzové situácie) a životného prostredia (1).

HPLC: vysokoúčinná kvapalinová chromatografia.

IATA: integrovaný prístup k testovaniu a hodnoteniu.

IC_{50}: môže sa odhadnúť stanovením koncentrácie, pri ktorej referenčná chemikália znižuje životaschopnosť tkanív o 50 % (IC_{50}) po pevne stanovenom expozičnom čase, pozri takisto ET_{50}.

Nekonečná dávka: množstvo testovanej chemikálie aplikovanej na epidermu, ktoré prekračuje množstvo potrebné na úplné a rovnomerné pokrytie povrchu epidermy.

Zmes: zmes alebo roztok zložený z dvoch alebo viacerých látok.

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej 80 hm %.

▼**M8**

MTT: 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium bromid, tiazolylová modrá tetrazóliumbromid.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii ≥ 10 hm. % a < 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo k chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

NSC_{killed}: nešpecifická farba v usmrtených tkanivách.

NSC_{living}: nešpecifická farba v živých tkanivách.

NSMTT: nešpecifická redukcia MTT.

Normy výkonnosti (PS): normy založené na validovanej testovacej metóde, ktoré slúžia ako základ na hodnotenie porovnateľnosti navrhovanej testovacej metódy, ktorá je mechanicky a funkčne podobná. Patria sem: i) nevyhnutné zložky testovacej metódy; ii) minimálny zoznam referenčných chemikálií vybraných spomedzi chemikálií používaných na preukázanie prijateľnej výkonnosti validovanej testovacej metódy a iii) porovnateľné úrovne presnosti a spoľahlivosti založené na tom, čo sa získalo pri validovanej testovacej metóde, ktoré by navrhovaná testovacia metóda mala preukázať pri hodnotení pomocou minimálneho zoznamu referenčných chemikálií (9).

PC: pozitívna kontrola, replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému a ošetrený chemikáliou, ktorá je známa tým, že vyvoláva pozitívnu reakciu. Aby bolo možné vyhodnotiť variabilitu reakcie na pozitívnu kontrolu v čase, rozsah pozitívnej reakcie by nemal byť nadmerný.

Relevantnosť: opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej sa testom správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testovacej metódy (9).

Spoľahlivosť: vyjadruje rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti (9).

Náhradný test: test navrhnutý ako náhrada za test, ktorý sa bežne používa a je schválený na identifikáciu nebezpečnosti a/alebo hodnotenie rizika a o ktorom sa rozhodlo, že poskytuje rovnakú alebo zvýšenú úroveň ochrany zdravia ľudí alebo zvierat alebo životného prostredia v porovnaní so schváleným testom pre všetky možné testované situácie a chemikálie (9).

Testovací cyklus: testovací cyklus pozostáva z jednej alebo viacerých testovaných chemikálií testovaných súbežne s negatívnou kontrolou a s PC.

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych testovaných chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky, a ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (9).

▼M8

Podráždenie kože *in vivo*: vznik vratného poškodenia kože po aplikácii testovanej chemikálie v trvaní do štyroch hodín. Podráždenie kože je lokálne vyvolaná reakcia ovplyvneného kožného tkaniva a objaví sa krátko po stimulácii (38). Je spôsobené lokálnou zápalovou reakciou spojenou s vrodeným (nešpecifickým) imunitným systémom kožného tkaniva. Jeho charakteristickou vlastnosťou je vratný proces zahŕňajúci zápalové reakcie a väčšinu klinických prejavov podráždenia charakteristických pre zápalový proces (erytém, edém, svrbenie a bolesť).

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych testovaných chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky, a ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (9).

Látka: chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie ich stability a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ktorý však nezahŕňa žiadne rozpúšťadlá, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo zmeny jej zloženia.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

UPLC: ultra vysokoúčinná kvapalinová chromatografia.

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

▼**M8**

Dodatok 2

TESTOVACIE MODELY ZAHRNUTÉ DO TEJTO TESTOVACEJ METÓDY

Č.	Názov testovacieho modelu	Typ validačnej štúdie	Odkazy
1	EpiSkin™	Úplná prospektívna validačná štúdia (2003 – 2007). Zložky tohto modelu boli použité na určenie nevyhnutných zložiek testovacej metódy v rámci pôvodných a aktualizovaných PS ECVAM (39) (40) (21) (*) . Okrem toho údaje o metóde týkajúce sa identifikácie neklasifikovaných a klasifikovaných látok tvorili základné východisko na vymedzenie hodnôt špecifickosti a citlivosti pôvodných PS (*) .	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*pôvodný*): Testovací model najprv podstúpil úplnú prospektívnu validáciu spolu s č. 1 z rokov 2003 – 2007. Zložky tohto modelu boli použité na určenie nevyhnutných zložiek testovacej metódy v rámci pôvodných a aktualizovaných PS ECVAM (39) (40) (21) (*). **EpiDerm™ SIT (EPI-200):** Zmena pôvodného EpiDerm™ bola validovaná pomocou pôvodných PS ECVAM (21) v roku 2008 (*)	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Validačná štúdia založená na pôvodných normách výkonnosti ECVAM (21) v roku 2008 (*) .	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Validačná štúdia (2011 – 2012) založená na normách výkonnosti (PS) usmernenia OECD TG 439 (8), ktoré sú založené na aktualizovaných PS ECVAM (*) (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) a PS tohto TG (8) (*)

(*) Pôvodné normy výkonnosti (PS) ECVAM (21) boli vypracované v roku 2007 po dokončení prospektívnej validačnej štúdie (16), v ktorej sa posudzovala výkonnosť testovacích modelov č. 1 a 2 v súvislosti so systémom klasifikácie, ako sa uvádza v 28. zmene smernice EÚ o nebezpečných látkach (41). V roku 2008 sa zaviedol GHS OSN (1) a nadobudlo účinnosť nariadenie CLP EÚ, ktoré fakticky posunuli hraničnú hodnotu na rozlišovanie neklasifikovaných a klasifikovaných látok z hodnoty *in vivo* 2.0 na 2.3. S cieľom prispôsobiť sa tejto zmenenej regulačnej požiadavke sa v roku 2009 aktualizovali hodnoty presnosti a zoznam referenčných chemikálií v rámci PS ECVAM (2) (39) (40). Tak ako pôvodné PS aj aktualizované PS boli z veľkej časti založené na údajoch z modelov č. 1 a 2 (16), ale navyše sa v nich použili údaje o referenčných chemikáliách z modelu č. 3. V roku 2010 sa aktualizované PS ECVAM použili na určenie PS súvisiacich s týmto TG (8). Na účely tejto testovacej metódy sa EpiSkin™ považuje za validovanú referenčnú metódu (VRM) vzhľadom na skutočnosť, že bol použitý na vypracovanie všetkých kritérií PS. Podrobné informácie o validačných štúdiách, súbor získaných údajov, ako aj odôvodnenie nevyhnutných zmien v PS v dôsledku vykonávania GHS OSN/nariadenia CLP možno nájsť vo vysvetľujúcom podkladovom dokumente ECVAM/BfR k príslušnému usmerneniu OECD TG 439 (23).

SIT: test podráždenia kože

RHE: zrekonštruovaná ľudská epiderma

▼**M8**

Dodatok 3

PARAMETRE PROTOKOLU ŠPECIFICKÉ PRE KAŽDÝ Z TESTOVACÍCH MODELOV ZAHRNUTÝCH DO TEJTO TESTOVACEJ METÓDY

Modely RhE vykazujú veľmi podobné protokoly a predovšetkým sa vo všetkých z nich používa postinkubačné obdobie 42 hodín (32) (33) (34) (35). Variácie sa týkajú hlavne troch parametrov týkajúcich sa rôznych bariérových funkcií testovacích modelov a sú uvedené tu: A) predinkubačný čas a objem; B) aplikácia testovaných chemikálií a C) postinkubačný objem.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Predinkubácia				
Inkubačný čas	18 – 24 hodín	18 – 24 hodín	< 2 hodiny	15 – 30 hodín
Stredný objem	2 ml	0,9 ml	0,3 alebo 1 ml	0,5 ml
B) Aplikácia testovaných chemikálií				
Pri kvapalinách	10 µl (26 µl/cm^2)	30 µl (47 µl/cm^2)	16 µl (32 µl/cm^2)	25 µl (83 µl/cm^2)
Pri tuhých látkach	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)
Použitie nylonového sitka	Nepoužíva sa	Podľa potreby	Používa sa	Nepoužíva sa
Celkový čas aplikácie	15 minút	60 minút	42 minút	15 minút
Teplota pri aplikácii	RT	a) pri RT na 25 minút b) pri 37 °C na 35 minút	RT	RT
C) Postinkubačný objem				
Stredný objem	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Maximálna prijateľná variabilita				
Štandardná odchýlka (SD) medzi replikátmi tkaniva	SD18	SD18	SD18	SD18

RT: izbová teplota
DW: destilovaná voda
DPBS: Dulbeccov fosfátový tlmivý fyziologický roztok

▼**M8**

Dodatok 4

KĽÚČOVÉ PARAMETRE A KRITÉRIÁ PRIJATEĽNOSTI NA KVALIFIKÁCIU SYSTÉMU HPLC/UPLC SPEKTROFOTOMETRIE NA MERANIE FORMAZÁNU MTT ZÍSKANÉHO Z TKANÍV RHE

Parameter	Protokol odvodený z usmernenia FDA (36) (37)	Kritériá prijateľnosti
Selektívnosť	Analýza izopropanolu, living blank (izopropanolový extrakt zo živých tkanív RhE bez akéhokoľvek ošetrenia), dead blank (izopropanolový extrakt z usmrtených tkanív RhE bez akéhokoľvek ošetrenia)	Oblasť interferencie ($Area_{interference}$) ≤ 20 % oblasti LLOQ ($Area_{LLOQ}$) ([1])
Exaktnosť	Kontroly kvality (t. j. formazán MTT v objeme 1,6 µg/ml, 16 µg/ml a 160 µg/ml) v izopropanole (n = 5)	CV ≤ 15 % alebo ≤ 20 % v prípade LLOQ
Presnosť	Kontroly kvality v izopropanole (n = 5)	% Dev ≤ 15 % alebo ≤ 20 % v prípade LLOQ
Matricový efekt	Kontroly kvality v living blank (n = 5)	85 % ≤ % matricového efektu ≤ 115 %
Prenos	Analýza izopropanolu podľa normy ULOQ ([2])	Oblasť interferencie ($Area_{interference}$) ≤ 20 % oblasti LLOQ ($Area_{LLOQ}$)
Reprodukovateľnosť (v priebehu dňa)	3 nezávislé kalibračné krivky (na základe 6 po sebe nasledujúcich riedení formazánu MTT v izopropanole v pomere 1:3, začínajúc pri ULOQ, t. j. 200 µg/ml); Kontroly kvality v izopropanole (n = 5)	Kalibračné krivky: % Dev ≤ 15 % alebo ≤ 20 % v prípade LLOQ Kontroly kvality: % Dev ≤ 15 % a CV ≤ 15 %
Reprodukovateľnosť (v priebehu dní)	Deň 1: 1 kalibračná krivka a kontroly kvality v izopropanole (n = 3) Deň 2: 1 kalibračná krivka a kontroly kvality v izopropanole (n = 3) Deň 3: 1 kalibračná krivka a kontroly kvality v izopropanole (n = 3)	
Krátkodobá stabilita formazánu MTT v extrakte tkaniva RhE	Kontroly kvality v living blank (n = 3) analyzovanom v deň prípravy a po 24 hodinách skladovania pri izbovej teplote	% Dev ≤ 15 %
Dlhodobá stabilita formazánu MTT v extrakte tkaniva RhE, ak je to potrebné	Kontroly kvality v living blank (n = 3) analyzovanom v deň prípravy a po niekoľkých dňoch skladovania pri stanovenej teplote (napr. 4 °C, –20 °C, –80 °C)	% Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: nižší limit kvantifikácie, vymedzený tak, aby zahŕňal životaschopnosť tkaniva 1 – 2 %, teda 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ: vyšší limit kvantifikácie, vymedzený tak, aby bol najmenej dvojnásobne vyšší než najvyššia očakávaná koncentrácia formazánu MTT v izopropanolových extraktoch z negatívnych kontrol, teda 200 µg/ml.

▼M7

B.47. TESTOVACIA METÓDA ZÁKALU A PRIEPUSTNOSTI HOVÄDZEJ ROHOVKY NA IDENTIFIKÁCIU I) CHEMIKÁLIÍ VYVOLÁVAJÚCICH VÁŽNE POŠKODENIE OČÍ A II) CHEMIKÁLIÍ, KTORÉ SI NEVYŽADUJÚ KLASIFIKÁCIU AKO CHEMIKÁLIE SPÔSOBUJÚCE PODRÁŽDENIE OČÍ ALEBO VÁŽNE POŠKODENIE OČÍ

ÚVOD

Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 437 (2013). Testovaciu metódu zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky ohodnotil Medziagentúrny koordinačný výbor pre validáciu alternatívnych metód (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) v spojení s Európskym centrom pre validáciu alternatívnych metód (European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM) a Japonským centrom pre validáciu alternatívnych metód (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, JaCVAM) v rokoch 2006 a 2010 (1)(2). V prvom hodnotení bola testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky hodnotená z hľadiska užitočnosti pri identifikácii chemikálií (látok a zmesí), ktoré vyvolávajú vážne poškodenie očí (1). V druhom hodnotení bola uvedená testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky hodnotená z hľadiska užitočnosti pri identifikácii chemikálií (látok a zmesí), ktoré nie sú klasifikované ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí (2). Validačná databáza testovacích metód zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky zahŕňala spolu 113 látok a 100 zmesí (2)(3). Z týchto hodnotení a ich partnerského preskúmania sa vyvodil záver, že testovacou metódou možno správne identifikovať chemikálie (látky aj zmesi), ktoré vyvolávajú vážne poškodenie očí (kategória 1), ako aj chemikálie, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí, ako sa definuje v Globálnom harmonizovanom systéme klasifikácie a označovania chemikálií (GHS) Organizácie spojených národov (OSN) (4) a v nariadení (ES) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (nariadenie CLP) ([1]), a preto bola schválená ako vedecky platná na oba účely. Vážne poškodenie očí je vyvolanie poškodenia tkaniva v oku alebo vážne fyzické zhoršenie zraku po aplikácii testovanej chemikálie na predný povrch oka, ktoré nie je úplne reverzibilné do 21 dní po aplikácii. Testované chemikálie vyvolávajúce vážne poškodenie očí sa podľa GHS OSN klasifikujú ako kategória 1. Chemikálie neklasifikované ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí sú definované ako chemikálie, ktoré nespĺňajú požiadavky na klasifikáciu v kategórii 1 alebo 2 GHS OSN (2A alebo 2B), t. j. uvádzajú sa ako chemikálie „bez kategórie“ v zmysle GHS OSN. Táto testovacia metóda zahŕňa odporúčané použitie a obmedzenia testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky na základe jej hodnotení. Hlavné rozdiely medzi pôvodnou verziou usmernenia OECD na vykonávanie testov z roku 2009 a jeho aktualizovanou verziou z roku 2013 sa okrem iného vzťahujú na: použitie testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky na identifikáciu chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu podľa GHS OSN (body 2 a7); objasnenie uplatniteľnosti testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky na testovanie alkoholov, ketónov a tuhých látok (body 6 a 7) a látok a zmesí (bod 8); objasnenie toho, ako by sa mali testovať povrchovo aktívne látky (surfaktanty) a zmesi, ktoré obsahujú povrchovo aktívne látky (bod 28); aktualizácie a objasnenia týkajúce sa pozitívnych kontrol (body 39 a 40); aktualizáciu rozhodovacích kritérií, pokiaľ ide o testovaciu metódu zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky (bod 47); aktualizáciu kritérií prijateľnosti štúdie (bod 48); aktualizáciu prvkov skúšobného protokolu (bod 49); aktualizáciu dodatku 1, pokiaľ ide o definície; doplnenie dodatku 2 o prediktívnej schopnosti testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky v rámci rôznych klasifikačných systémov; aktualizáciu dodatku 3, pokiaľ ide o zoznam chemikálií na preukázanie spôsobilosti a aktualizáciu dodatku 4, pokiaľ ide o držiak rohovky testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky (bod 1) a o opacitometer (body 2 a 3).

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006, Ú. v. EÚ L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼M7

V súčasnosti sa všeobecne uznáva, že ani jediný *in vitro* test očnej dráždivosti nedokáže v blízkej budúcnosti nahradiť Draizov *in vivo* očný test slúžiaci na predpovedanie celého radu podráždení pri rôznych triedach chemikálií. Je však možné, že Draizov očný test dokážu nahradiť strategické kombinácie niekoľkých alternatívnych testovacích metód v rámci (viacstupňovej) testovacej stratégie (5). Prístup zhora nadol (5) je určený na použitie vtedy, keď sa na základe existujúcich informácií očakáva, že chemikália bude mať veľký potenciál spôsobiť podráždenie, zatiaľ čo prístup zdola nahor (5) sa má použiť vtedy, keď sa na základe existujúcich informácií očakáva, že chemikália spôsobí podráždenie očí v dostatočnej miere na to, aby si vyžadovala klasifikáciu. Testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky je *in vitro* testovacia metóda, ktorú možno použiť za určitých okolností a so špecifickými obmedzeniami, pokiaľ ide o klasifikáciu chemikálií z hľadiska ich nebezpečnosti pre oči a ich označovanie. Hoci sa testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky nepokladá za platnú samostatnú náhradu za očný test *in vivo* na králikoch, odporúča sa ako úvodný krok v rámci testovacej stratégie, ako je prístup zhora nadol, ktorý odporúča Scott *et al.* (5) na identifikáciu chemikálií vyvolávajúcich vážne poškodenie očí, t. j. chemikálií, ktoré sa majú klasifikovať ako kategória 1 GHS OSN bez ďalšieho testovania (4). Testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky sa takisto odporúča na identifikáciu chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí podľa definície GHS OSN (bez kategórie v zmysle GHS OSN) (4) v rámci testovacej stratégie, ako je prístup zdola nahor (5). Chemikália, o ktorej sa na základe testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky nepredpokladá, že spôsobí vážne poškodenie očí alebo že nebude klasifikovaná ako chemikália spôsobujúca podráždenie/vážne poškodenie očí, by si však na stanovenie konečnej klasifikácie vyžadovala ďalšie testovanie (*in vitro* a/alebo *in vivo*).

Účelom tejto testovacej metódy je opísať postupy používané na hodnotenie potenciálu testovanej chemikálie predstavovať nebezpečnosť pre oči, a to na základe merania jej schopnosti vyvolať zákal a zvýšenú priepustnosť v izolovanej hovädzej rohovke. Toxické účinky na rohovku sa merajú: i) zníženou priepustnosťou svetla (zákalom) a ii) zvýšeným prepúšťaním farbiva fluoresceínu sodného (priepustnosťou). Výsledky posudzovania zákalu a priepustnosti rohovky po vystavení účinkom testovanej chemikálie sa skombinujú a odvodí sa z nich skóre *in vitro* dráždivosti (*In Vitro* Irritancy Score, IVIS), ktoré sa používa na klasifikáciu úrovne dráždivosti testovanej chemikálie.

Definície sa uvádzajú v dodatku 1.

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

Táto testovacia metóda vychádza z protokolu testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky ICCVAM (6)(7), ktorý bol pôvodne vypracovaný na základe informácií z protokolu Inštitútu pre vedy *in vitro* a z protokolu INVITTOX 124 (8). Protokol INVITTOX 124 predstavuje protokol používaný pri predbežnej validačnej štúdii, ktorú financovalo Európske spoločenstvo a ktorá prebehla v rokoch 1997 – 1998. Obidva protokoly vychádzajú z testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky, ktorú prvýkrát zverejnil Gautheron *et al.* (9).

Testovaciu metódu zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky možno použiť na identifikáciu chemikálií vyvolávajúcich vážne poškodenie očí v zmysle GHS OSN, t. j. chemikálií, ktoré sa majú klasifikovať ako chemikálie kategórie 1 GHS OSN (4). Keď sa testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky používa na tento účel, vykazuje celkovú presnosť 79 % (150/191), mieru falošnej pozitivity 25 % (32/126) a mieru falošnej negativity 14 % (9/65) v porovnaní s údajmi z metódy očného testu *in vivo* na králikoch s klasifikáciou podľa klasifikačného systému GHS OSN (3) (pozri dodatok 2 tabuľku 1). Keď sa testované chemikálie v rámci určitých chemických (t. j. alkoholy, ketóny) alebo fyzikálnych (t. j. tuhé látky) tried vylúčia z databázy, testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky vykazuje podľa klasifikačného systému GHS

▼M7

OSN celkovú presnosť 85 % (111/131), mieru falošnej pozitivity 20 % (16/81), a mieru falošnej negativity 8 % (4/50) (3). Potenciálne nedostatky testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky pri jej použití na identifikáciu chemikálií vyvolávajúcich vážne poškodenie očí (kategória 1 GHS OSN) spočívajú vo vysokej miere falošnej pozitivity pri alkoholoch a ketónoch a vysokej miere falošnej negativity pri tuhých látkach, ktoré sa zistili vo validačnej databáze (1)(2)(3). Avšak vzhľadom na to, že nie všetky alkoholy a ketóny sú testovacou metódou zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky nadhodnotené a o niektorých sa správne predpokladalo zaradenie do kategórie 1 GHS OSN, nepokladajú sa tieto dve organické funkčné skupiny sa za skupiny mimo oblasti uplatniteľnosti tejto testovacej metódy. Používateľ tejto testovacej metódy sa bude musieť rozhodnúť, či v prípade alkoholov a ketónov možno prípadný nadhodnotený predpoklad akceptovať, alebo či by sa malo vykonať ďalšie testovanie formou analýzy váhy dôkazov. Pokiaľ ide o miery falošnej negativity v prípade tuhých látok, malo by sa poznamenať, že tuhé látky môžu pri Draizovom *in vivo* teste očnej dráždivosti viesť k premenlivým a extrémnym podmienkam expozície, dôsledkom čoho môžu byť predpoklady týkajúce sa ich skutočného potenciálu spôsobiť podráždenie irelevantné (10). Malo by sa takisto uviesť, že falošne negatívne výsledky identifikované vo validačnej databáze ICCVAM (2)(3) v súvislosti s identifikáciou chemikálií vyvolávajúcich vážne poškodenie očí (kategória 1 GHS OSN) v žiadnom prípade neviedli k hodnote IVIS ≤ 3, čo je kritérium používané na identifikáciu testovanej chemikálie ako chemikálie bez kategórie v zmysle GHS OSN. Okrem toho falošné negatívne výsledky testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky v tejto súvislosti nie sú rozhodujúce, keďže všetky testované chemikálie, ktoré vedú k hodnote 3 < IVIS ≤ 55, by sa následne testovali pomocou iných adekvátne validovaných *in vitro* testov, alebo – ako posledná možnosť na králikoch, v závislosti od regulačných požiadaviek pomocou stratégie postupného testovania v rámci analýzy váhy dôkazov. Vzhľadom na skutočnosť, že v prípade niektorých tuhých chemikálií sa na základe testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky správne predpokladá ich zaradenie do kategórie 1 GHS OSN, nepovažuje sa ani toto fyzikálne skupenstvo za nachádzajúce sa mimo oblasti uplatniteľnosti testovacej metódy. Výskumní pracovníci by mohli zvážiť použitie tejto testovacej metódy pri všetkých typoch chemikálií, pričom hodnota IVIS > 55 by sa mala prijať ako indikátor reakcie vyvolávajúcej vážne poškodenie očí, na základe čoho by sa mala uplatniť klasifikácia v kategórii 1 GHS OSN bez ďalšieho testovania. Ako už bolo uvedené, pozitívne výsledky získané v prípade alkoholov alebo ketónov by sa však mali interpretovať opatrne, v dôsledku prípadného nadhodnotenia.

Testovaciu metódu zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky možno takisto použiť na identifikáciu chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí podľa klasifikácie GHS OSN (4). Keď sa testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky používa na tento účel, vykazuje celkovú presnosť 69 % (135/196), mieru falošnej pozitivity 69 % (61/89), a mieru falošnej negativity 0 % (0/107) v porovnaní s údajmi o metóde očného testu *in vivo* na králikoch s klasifikáciou podľa klasifikačného systému GHS OSN (3) (pozri dodatok 2 tabuľku 2). Zistená miera falošnej pozitivity (chemikálie bez kategórie v zmysle GHS OSN na základe testov *in vivo* s hodnotou IVIS > 3, pozri bod 47) je značne vysoká, no v tejto súvislosti nie je rozhodujúca, keďže všetky testované chemikálie, ktoré vedú k hodnote 3 < IVIS ≤ 55, by sa následne testovali pomocou iných adekvátne validovaných *in vitro* testov, alebo – ako posledná možnosť na králikoch, v závislosti od regulačných požiadaviek pomocou stratégie postupného testovania v rámci analýzy váhy dôkazov. Testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky nevykazuje žiadne osobitné nedostatky v súvislosti s testovaním alkoholov, ketónov a tuhých látok, keď je jej účelom identifikovať chemikálie, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí (bez kategórie v zmysle GHS OSN) (3). Výskumní pracovníci by mohli zvážiť použitie tejto testovacej metódy v prípade všetkých typov chemikálií, pričom negatívny výsledok (IVIS ≤ 3) by sa mal prijať ako indikátor toho, že nie je potrebná klasifikácia (bez kategórie v zmysle GHS OSN). Keďže testovacou metódou zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky možno správne identifikovať len 31 % chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí, nemala by byť táto testovacia metóda prvou voľbou na iniciovanie prístupu zdola nahor, ak sú dostupné iné validované a uznané *in vitro* metódy s podobným stupňom citlivosti, no vyššou špecifickosťou.

▼M7

Validačná databáza testovacích metód zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky obsahovala spolu 113 látok a 100 zmesí (2)(3). Testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky sa preto považuje za metódu uplatniteľnú na látky, ako aj zmesi.

Testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky sa neodporúča na identifikáciu testovaných chemikálií, ktoré by sa mali klasifikovať ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí (kategória 2 alebo kategória 2A GHS OSN), alebo testovaných chemikálií, ktoré by sa mali klasifikovať ako chemikálie spôsobujúce mierne podráždenie očí (kategória 2B GHS OSN), vzhľadom na značné množstvo chemikálií kategórie 1 GHS OSN, ktoré sú zaradené do príliš nízkej kategórie, ako napr. kategória 2, 2A alebo 2B, a chemikálií bez kategórie v zmysle GHS OSN, ktoré sú zaradené do príliš vysokej kategórie, ako napr. kategória 2, 2A alebo 2B GHS OSN (2)(3). Na tento účel sa môže vyžadovať ďalšie testovanie pomocou inej vhodnej metódy.

Pri všetkých postupoch, pri ktorých sa používajú hovädzie oči a hovädzie rohovky, by sa mali dodržiavať platné nariadenia a postupy pre dané testovacie zariadenie v oblasti zaobchádzania s materiálom živočíšneho pôvodu, medzi ktoré okrem iného patria tkanivá a tkanivové tekutiny. Odporúčajú sa všeobecne platné laboratórne bezpečnostné opatrenia (11).

Zatiaľ čo pri testovacej metóde zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky sa nezohľadňujú spojovkové a dúhovkové poškodenia, zohľadňujú sa v nej účinky na rohovku, ktoré sú hlavným faktorom klasifikácie *in vivo* pri klasifikácii v zmysle GHS OSN. Reverzibilitu lézií rohovky nemožno v testovacej metóde zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky posudzovať ako takú. Na základe štúdií na očiach králikov sa navrhlo, aby sa posúdenie počiatočnej hĺbky poškodenia rohovky mohlo používať na identifikáciu niektorých druhov ireverzibilných účinkov (12). Na porozumenie toho, ako dochádza k ireverzibilným účinkom, ktoré nesúvisia s počiatočným vysokým stupňom poškodenia, sú však potrebné ďalšie vedecké poznatky. Nakoniec treba poznamenať, že testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky neumožňuje posúdenie potenciálu systémovej toxicity súvisiacej s vystavením očí.

Táto testovacia metóda sa bude s prehodnocovaním nových informácií a údajov pravidelne aktualizovať. Napríklad v prípade potreby ucelenejšej charakteristiky poškodenia rohovky by prípadne mohla byť užitočná histopatológia. Podľa usmerňovacieho dokumentu OECD č. 160 (13) sa používateľom odporúča uchovať rohovky a pripraviť histopatologické vzorky, ktoré možno použiť na vytvorenie databázy a zavedenie rozhodovacích kritérií, ktoré by mohli ďalej zlepšiť presnosť tejto testovacej metódy

V každom laboratóriu, ktoré používa túto metódu prvý raz, by sa mali použiť chemikálie na preukázanie spôsobilosti uvedené v dodatku 3. Laboratórium môže použiť tieto chemikálie na účely preukázania svojej odbornej spôsobilosti na vykonávanie testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky pred predložením údajov z testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky na účely regulačnej klasifikácie nebezpečnosti.

PRINCÍP TESTU

Testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky predstavuje organotypický model, ktorý poskytuje krátkodobé udržanie normálnej fyziologickej a biochemickej funkcie hovädzej rohovky *in vitro*. V rámci tejto testovacej metódy sa poškodenie testovanou chemikáliou posudzuje kvantitatívnymi meraniami zmien zákalu rohovky pomocou opacitometra a priepustnosti rohovky pomocou spektrofotometra vo viditeľnej oblasti svetla. Obe merania sa používajú na výpočet hodnoty IVIS, ktorá sa používa na priradenie klasifikačnej kategórie nebezpečnosti podráždenia *in vitro* na účely predpokladu potenciálu testovanej chemikálie spôsobiť podráždenie očí *in vivo* (pozri rozhodovacie kritériá v bode 48).

V testovacej metóde zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky sa používajú izolované rohovky z očí čerstvo zabitého dobytka. Zákal rohovky sa meria kvantitatívne ako množstvo rohovkou prepusteného svetla. Priepustnosť sa meria kvantitatívne ako množstvo farbiva fluoresceínu sodného, ktoré prejde celou hrúbkou

▼M7

rohovky, zistené v médiu v zadnej komore. Testované chemikálie sa nanášajú na epitelový povrch rohovky pridaním do prednej komory držiaka rohovky. V dodatku 4 je uvedený opis a schéma držiaka rohovky, ktorý sa používa v testovacej metóde zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky. Držiaky rohovky sa dajú zakúpiť z rôznych zdrojov, alebo sa dajú zhotoviť.

Zdroj a vek hovädzích očí a výber druhov zvierat

Dobytok posielaný na bitúnky sa zvyčajne usmrcuje na ľudskú spotrebu alebo na iné komerčné použitia. Ako zdroj rohoviek na použitie v testovacej metóde zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky sa používajú iba zdravé zvieratá, ktoré sa považujú za vhodné na vstup do ľudského potravinového reťazca. Keďže dobytok má široký rozsah hmotnosti a závisí od plemena, veku a pohlavia, neexistuje žiadne odporúčanie týkajúce sa hmotnosti zvierat v čase zabitia.

Odlišné rozmery rohoviek môžu byť výsledkom použitia očí zo zvierat v rôznom veku. Rohovky s horizontálnym priemerom > 30,5 mm a so stredovou hrúbkou rohovky ≥ 1 100 μm sa zvyčajne získavajú z dobytka staršieho ako osem rokov, zatiaľ čo rohovky s horizontálnym priemerom < 28,5 mm a so stredovou hrúbkou rohovky < 900 μm sa zvyčajne získavajú z dobytka mladšieho ako päť rokov (14). Z toho dôvodu sa oči dobytka staršieho ako 60 mesiacov väčšinou nepoužívajú. Oči dobytka mladšieho ako 12 mesiacov sa takisto bežne nepoužívajú, pretože tieto oči sa ešte vyvíjajú a hrúbka rohovky a jej priemer sú značne menšie než je hrúbka a priemer rohoviek, ktoré sa uvádzajú v prípade očí dospelého dobytka. Použitie rohoviek mladých zvierat (t. j. vo veku 6 až 12 mesiacov) je však prípustné, pretože má niekoľko výhod, ako je lepšia dostupnosť, užší vekový rozsah a nižšia miera nebezpečnosti, pokiaľ ide o potenciálne vystavenie pracovníkov bovinnej spongiformnej encefalopatii (15). Keďže by bolo prínosné vykonať ďalšie posúdenie vplyvu veľkosti alebo hrúbky rohovky na schopnosť reagovať na žieravé a dráždivé chemikálie, odporúča sa, aby používatelia uvádzali odhadovaný vek a/alebo hmotnosť zvierat, ktorých rohovky boli použité v štúdii.

Odber a doprava očí do laboratória

Odber očí vykonávajú zamestnanci bitúnkov. V snahe minimalizovať mechanické a iné druhy poškodenia očí by sa oči mali odobrať čo najskôr po usmrtení zvieraťa a hneď po odobratí a počas prepravy by sa mali chladiť. Zamestnanci bitúnkov by pri oplachovaní hlavy zvieraťa nemali použiť žiadny detergent, aby sa predišlo vystaveniu očí účinkom potenciálne dráždivých chemikálií.

Oči by sa mali úplne ponoriť do vychladnutého Hanksovho vyváženého soľného roztoku (ďalej len „HBSS“) v nádobe s vhodnou veľkosťou a dopraviť do laboratória takým spôsobom, aby sa minimalizovalo poškodenie a/alebo kontaminácia baktériami. Keďže oči sa odoberajú počas zabíjania, môžu byť vystavené krvi alebo iným biologickým materiálom vrátane baktérií a iných mikroorganizmov. Preto je dôležité zabezpečiť, aby bolo riziko kontaminácie minimálne [napr. tak, že sa nádoba, v ktorej sú oči uložené, bude počas odberu a prepravy udržiavať na mokrom ľade a že sa do HBSS, ktorý sa používa na skladovanie očí pri preprave, pridajú antibiotiká (napr. penicilín v dávke 100 IU/ml a streptomycín v dávke 100 μg/ml)].

Časový interval medzi odberom očí a použitím rohoviek v testovacej metóde zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky by sa mal minimalizovať (zvyčajne sa rohovky použijú v ten istý deň, ako sa vykoná odber) a dokázateľne by nemal spochybniť výsledky skúšky. Tieto výsledky sú založené na kritériách výberu očí, ako aj na reakciách pozitívnych a negatívnych kontrol. Všetky oči použité v skúške by mali byť z tej istej skupiny očí odobratých v určitý deň.

Kritériá výberu očí používaných v testovacej metóde zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky

Keď sa oči dopravia do laboratória, pozorne sa prekontrolujú s ohľadom na poškodenia vrátane zvýšeného zákalu, škrabnutí a neovaskularizácie. Použiť sa majú len rohovky z očí, ktoré nie sú takto poškodené.

▼M7

V ďalších krokoch skúšky sa posudzuje aj kvalita každej rohovky. Rohovky, ktoré majú zákal silnejší ako sedem zákalových jednotiek alebo zákal ekvivalentnej hodnoty pre použitý opacitometer a príslušné držiaky rohovky po prvej hodine dosahovania rovnovážneho stavu, sa majú vyradiť (*POZNÁMKA:* opacitometer by sa mal kalibrovať zákalovými štandardmi, ktoré sa použijú na určenie zákalových jednotiek, pozri dodatok 4).

Každá ovplyvnená skupina (testovaná chemikália, súbežné negatívne a pozitívne kontroly) pozostáva minimálne z troch očí. V testovacej metóde zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky by sa mali použiť tri rohovky na negatívnu kontrolu. Keďže všetky odobrané rohovky sú vyrezané z celej očnej gule a pripevnené do rohovkových komôr, existuje možnosť, že táto manipulácia bude mať vplyv na jednotlivé hodnoty zákalu a priepustnosti rohovky (vrátane negatívnej kontroly). Okrem toho hodnoty zákalu a priepustnosti rohoviek z kontrol na negatívnu kontrolu sa používajú na korigovanie hodnôt zákalu a priepustnosti rohovky po ovplyvnení testovanou chemikáliou a hodnôt z pozitívnej kontroly vo výpočtoch IVIS.

POSTUP

Príprava očí

Rohovky, ktoré nie sú poškodené, sa vyrežú s 2 až 3 mm okrajom očného bielka, ktorý pomáha pri následnej manipulácii, pričom sa dáva pozor na to, aby nedošlo k poškodeniu epitelu a endotelu rohovky. Izolované rohovky sa upevnia do špeciálne navrhnutých držiakov rohovky pozostávajúcich z prednej a zadnej komory, ktoré sú jednotlivo prepojené s epitelovou a s endotelovou stranou rohovky. Obidve komory sa naplnia až po okraj predhriatym minimálnym základným médiom podľa Eagla (Eagle's Minimum Essential Medium, EMEM) bez fenolovej červene (najskôr zadná komora), pričom sa zabezpečí, aby sa nevytvorili bubliny. Zariadenie sa potom nechá ustáliť na teplotu 32 ± 1 °C aspoň jednu hodinu, čím sa umožní, aby sa teplota rohoviek vyrovnala s teplotou média a aby rohovky dosiahli bežnú metabolickú aktivitu v najväčšej možnej miere (približná teplota povrchu rohovky *in vivo* je 32 °C).

Po dobe ustálovania sa do oboch komôr pridá čerstvé predhriate EMEM bez fenolovej červene a pri každej rohovke sa odčítajú základné údaje o zákale. Všetky rohovky, ktoré vykazujú makroskopické poškodenie tkaniva (napr. škrabnutia, pigmentáciu, neovaskularizáciu), alebo zákal silnejší ako sedem zákalových jednotiek, alebo ekvivalentnú hodnotu nameranú s použitím opacitometra a držiaka rohovky, sa vyradia. Minimálne tri rohovky sa vyberú ako rohovky na negatívnu kontrolu (alebo kontrolu rozpúšťadla). Zvyšné rohovky sa potom rozdelia do ovplyvnených skupín a pozitívnych kontrolných skupín.

Keďže tepelná kapacita vody je vyššia ako tepelná kapacita vzduchu, voda poskytuje stabilnejšie teplotné podmienky na inkubáciu. Preto sa odporúča použiť vodný kúpeľ na udržiavanie držiaka rohovky a jeho obsahu na teplote 32 ± 1 °C. Takisto však možno použiť vzdušné inkubátory za predpokladu, že sa zabezpečí udržiavanie stabilnej teploty (napr. predhriatím držiakov a médií).

Aplikácia testovanej chemikálie

Používajú sa dva rôzne protokoly o ovplyvnení, jeden na kvapaliny a povrchovo aktívne látky (tuhé látky alebo kvapaliny) a jeden na povrchovo neaktívne tuhé látky.

Kvapaliny sa testujú nezriedené. Polotuhé látky, krémy a vosky sa zvyčajne testujú ako kvapaliny. Čisté povrchovo aktívne látky sa testujú pri koncentrácii 10 % hmotnostnej koncentrácie v 0,9 % roztoku chloridu sodného, destilovanej vody alebo iného rozpúšťadla, v prípade ktorého sa preukázalo, že nemá nepriaznivé účinky na testovací systém. Pri alternatívnych koncentráciách zriedenia by sa mali uviesť príslušné dôvody. Zmesi s obsahom povrchovo aktívnych látok

▼M7

možno testovať nezriedené alebo zriedené na vhodnú koncentráciu v závislosti od príslušného expozičného scenára *in vivo*. Pri testovaných koncentráciách by sa mali uviesť príslušné dôvody. Rohovky sa vystavia kvapalinám a povrchovo aktívnym látkam na 10 minút. Pri použití inej doby expozície by sa malo uviesť primerané vedecké zdôvodnenie. Definíciu povrchovo aktívnej látky a zmesi, ktorá obsahuje povrchovo aktívne látky, možno nájsť v dodatku 1.

Povrchovo neaktívne tuhé látky sa zvyčajne testujú ako roztoky alebo suspenzie pri koncentrácii 20 % hmotnostnej koncentrácie v 0,9 % roztoku chloridu sodného, v destilovanej vode alebo v inom rozpúšťadle, o ktorom sa preukázalo, že nemá žiadne nepriaznivé účinky na testovací systém. Za určitých okolností a pri náležitom vedeckom zdôvodnení sa tuhé látky môžu testovať aj čisté priamym nanesením na povrch rohovky s použitím metódy otvorenej komory (pozri bod 32). Rohovky sa vystavia pôsobeniu tuhých látok na štyri hodiny, no rovnako ako v prípade kvapalín a povrchovo aktívnych látok, možno použiť aj inú dĺžku vystavenia, ak sa primeraným spôsobom vedecky zdôvodní.

Je možné používať rôzne metódy ovplyvnenia, ich použitie závisí od fyzikálnej povahy a chemických vlastností (napr. tuhé látky, kvapaliny, viskózne či neviskózne kvapaliny) testovanej chemikálie. Kritický faktor spočíva v zabezpečení, aby testovaná chemikália primerane pokrývala epitelový povrch a aby sa pri oplachovaní dostatočne odstránila. Metóda uzavretej komory sa zvyčajne používa pri neviskóznych až mierne viskóznych kvapalných testovaných chemikáliách, zatiaľ čo metóda otvorenej komory sa zvyčajne používa v prípade poloviskóznych a viskóznych kvapalných testovaných chemikáliách a čistých tuhých látok.

V prípade metódy uzavretej komory sa do prednej komory cez dávkovacie otvory na hornom povrchu komory zavedie dostatočné množstvo testovanej chemikálie (750 µl) tak, aby sa ňou pokryla epitelová strana rohovky, a otvory komory sa následne uzavrú komorovými zátkami na čas vystavenia. Je dôležité zabezpečiť, aby každá rohovka bola vystavená pôsobeniu testovanej chemikálie počas primeranej doby.

Pri metóde otvorenej komory sa pred ovplyvnením vyberie prstencový zámok okienkovej dosky a sklenená doska z prednej komory. Kontrolná alebo testovaná chemikália (750 µl alebo dostatočné množstvo testovanej chemikálie na úplné pokrytie rohovky) sa pomocou mikropipety nanesie priamo na epitelový povrch rohovky. Ak sa testovaná chemikália ťažko pipetuje, môže sa na uľahčenie dávkovania naplniť do výtlakovej piestovej pipety. Špička výtlakovej piestovej pipety sa vloží do dávkovacieho hrotu injekčnej striekačky tak, aby sa materiál mohol zaviesť do vytláčacieho hrotu pod tlakom. S posúvaním piestu pipety nahor sa súčasne tlačí na piest injekčnej striekačky. Ak sa v špičke pipety objavia vzduchové bubliny, testovaná chemikália sa odstráni (vytlačí) a postup sa opakuje, pokiaľ sa špička nenaplní bez vzduchových bublín. V prípade potreby možno použiť obyčajnú injekčnú striekačku (bez ihly), pretože umožňuje odmeranie presného objemu testovanej chemikálie a jej ľahšie nanesenie na epitelový povrch rohovky. Po dávkovaní sa sklenené okienko vráti na svoje miesto v prednej komore a tým sa obnoví uzavretý systém.

Postexpozičná inkubácia

Po uplynutí doby expozície sa testovaná chemikália, chemikália na negatívnu kontrolu alebo chemikália na pozitívnu kontrolu odstránia z prednej komory a epitel sa umyje aspoň trikrát (alebo pokiaľ sa nedosiahne stav, že nie sú viditeľné žiadne znaky prítomnosti testovanej chemikálie) s EMEM (obsahujúcim fenolovú červeň). Médium s obsahom fenolovej červene sa používa na oplachovanie, lebo zmena farby fenolovej červene sa môže monitorovať, čím sa zistí účinnosť oplachovania kyslých alebo zásaditých testovaných chemikálií. Rohovky sa umývajú viac ako trikrát, ak je farba fenolovej červene stále zmenená (na žltú alebo fialovú), alebo ak je testovaná chemikália stále viditeľná. Keď médium neobsahuje testovanú chemikáliu, rohovky sa opláchnu posledný raz pomocou EMEM (bez fenolovej červene). EMEM (bez fenolovej červene) sa

▼M7

používa na konečné opláchnutie, aby sa zabezpečilo odstránenie fenolovej červene z prednej komory pred meraním zákalu. Predná komora sa potom znova naplní čerstvým EMEM bez fenolovej červene.

V prípade kvapalín alebo povrchovo aktívnych látok sa rohovky po opláchnutí inkubujú ďalšie dve hodiny pri teplote 32 ± 1 °C. Dlhší postexpozičný čas môže byť za určitých okolností užitočný a mohlo by sa o ňom uvažovať v konkrétnych prípadoch. Rohovky ovplyvnené tuhými látkami sa na konci štvorhodinovej doby expozície dôkladne opláchnu, ale nevyžaduje sa ďalšia inkubácia.

Na konci postexpozičnej inkubačnej doby (v prípade kvapalín a povrchovo aktívnych látok) a na konci štvorhodinovej doby vystavenia (v prípade povrchovo neaktívnych tuhých látok) sa zaznamená zákal a priepustnosť každej rohovky. Každá rohovka sa takisto vizuálne prehliadne a zaznamenajú sa prípadné zistenia (napr. zlupovanie tkaniva, zvyšky testovanej chemikálie, vzorky s nerovnomerným zákalom). Tieto pozorovania by mohli byť dôležité, lebo sa môžu prejaviť v odchýlkach vo výsledkoch odčítavaných z opacitometra.

Kontrolné chemikálie

Do každého pokusu sa zaradia súbežné negatívne kontroly alebo kontroly rozpúšťadla/nosiča a pozitívne kontroly.

Keď sa testuje kvapalná látka s koncentráciou 100 %, zaradí sa súbežná negatívna kontrola (napr. 0,9 % roztok chloridu sodného alebo destilovaná voda) do testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky, aby sa dali zistiť nešpecifické zmeny v testovacom systéme a aby sa poskytol základ pre sledované parametre skúšky. Tým sa takisto zabezpečí, aby v dôsledku podmienok skúšky nedošlo k neprimeranej reakcii vo forme podráždenia.

Keď sa testuje zriedená kvapalina, povrchovo aktívna látka alebo tuhá látka, do testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky sa zaradí súbežná kontrolná skupina rozpúšťadla/nosiča, aby sa dali zistiť nešpecifické zmeny v testovacom systéme a aby sa poskytol základ pre sledované parametre skúšky. Môže sa použiť iba také rozpúšťadlo/nosič, u ktorého sa preukázalo, že nemá žiadne nepriaznivé účinky na testovací systém.

Do každého pokusu sa zaradí chemikália známa schopnosťou vyvolať podráždenie očí ako súbežná pozitívna kontrola, čím sa overí integrita testovacieho systému a jeho správne vykonávanie. V snahe zabezpečiť možnosť posúdiť variabilitu reakcie pri pozitívnej kontrole v čase by však rozsah dráždivej reakcie nemal byť nadmerný.

Príklady pozitívnych kontrol pri kvapalných testovaných chemikáliách sú 100 % etanol alebo 100 % dimetylformamid. Príkladom pozitívnej kontroly pri tuhých testovaných chemikáliách je 20 % hmotnostnej koncentrácie imidazolu v 0,9 % roztoku chloridu sodného.

Referenčné chemikálie sú užitočné na posudzovanie potenciálu neznámych chemikálií určitej chemickej triedy alebo triedy výrobkov vyvolať očnú dráždivosť, alebo na posudzovanie potenciálu pomernej dráždivosti chemikálie spôsobujúcej podráždenie očí v rámci osobitného rozsahu dráždivých reakcií.

Merané sledované parametre

Zákal sa určuje množstvom prepusteného svetla cez rohovku. Zákal rohovky sa kvantitatívne meria pomocou opacitometra a výsledkom sú hodnoty zákalu merané na spojitej stupnici.

Priepustnosť sa určuje množstvom farbiva fluoresceínu sodného, ktoré prenikne cez všetky bunkové vrstvy rohovky (t. j. od epitelu na vonkajšom povrchu rohovky cez endotel na vnútornom povrchu rohovky). Jeden ml roztoku fluoresceínu sodného (4 mg/ml pri testovaní kvapalín a povrchovo aktívnych látok alebo 5 mg/ml pri testovaní povrchovo neaktívnych tuhých látok) sa pridá do prednej komory držiaka rohovky, ktorá je spojená s epitelovou stranou rohovky, zatiaľ čo zadná komora, ktorá je spojená s endotelovou stranou rohovky, sa naplní čerstvým EMEM. Držiak sa potom inkubuje v horizontálnej polohe počas 90 ± 5 minút pri teplote 32 ± 1 °C. Množstvo fluoresceínu sodného, ktorý prejde do

▼M7

zadnej komory, sa kvantitatívne odmeria pomocou UV/VIS spektrofotometrie. Spektrofotometrické merania hodnotené pri 490 nm sa zaznamenajú ako hodnoty optickej hustoty (OD_{490}) alebo absorbancie, ktoré sa merajú na spojitej stupnici. Hodnoty priepustnosti fluoresceínu sa stanovia použitím hodnôt OD_{490} nameraných spektrofotometrom pri viditeľnom svetle s použitím štandardnej dĺžky dráhy 1 cm.

Alternatívne sa môže použiť snímač 96-jamkovej mikrotitračnej platničky za predpokladu, že i) je možné vytvoriť lineárny rozsah snímača platničiek na stanovenie hodnôt OD_{490} pre fluoresceín a ii) použije sa správny objem vzoriek fluoresceínu na 96-jamkovej platničke, aby výsledkom boli hodnoty OD_{490}, ktoré sa rovnajú štandardnej dĺžke dráhy 1 cm [to by mohlo vyžadovať kompletné naplnenie jamky (zvyčajne 360 µl)].

PREENTOVANIE VÝSLEDKOV

Vyhodnotenie údajov

Keď sa vykoná korekcia hodnôt zákalu a priemerných hodnôt priepustnosti (OD_{490}) na zákal pozadia a hodnoty priepustnosti OD_{490} pre negatívnu kontrolu, priemerné hodnoty zákalu a priepustnosti OD_{490} pre každú ovplyvnenú skupinu by sa mali dosadiť do empiricky odvodeného vzorca na výpočet skóre *in vitro* dráždivosti (ďalej len „IVIS“) pre každú ovplyvnenú skupinu takto:

IVIS = priemerná hodnota zákalu + (15 × priemerná hodnota priepustnosti OD_{490})

Sina *et al.* (16) oznámili, že tento vzorec bol odvodený pri vnútrolaboratórnych a medzilaboratórnych štúdiách. Údaje vypočítané pre súbor 36 zlúčenín v rámci štúdie za účasti viacerých laboratórií boli podrobené analýze podľa viacerých náhodných premenných s cieľom určiť rovnicu, ktorá by najlepšie vyjadrovala vzťah medzi údajmi *in vivo* a *in vitro*. Túto analýzu vykonali vedci v dvoch nezávislých spoločnostiach a odvodili takmer totožné rovnice.

Hodnoty zákalu a priepustnosti by sa mali posudzovať aj samostatne, aby sa zistilo, či testovaná chemikália vyvolala žieravý účinok alebo silné podráždenie iba prostredníctvom jedného z dvoch sledovaných parametrov (pozri rozhodovacie kritériá).

Rozhodovacie kritériá

Ďalej sa uvádzajú hraničné hodnoty IVIS na identifikáciu testovaných chemikálií, ktoré vyvolávajú vážne poškodenie očí (kategória 1 GHS OSN), a testovaných chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí (bez kategórie v zmysle GHS OSN):

IVIS	GHS OSN
≤ 3	bez kategórie
> 3; ≤ 55	predpoklad nie je možný
> 55	kategória 1

Kritériá prijateľnosti testu

Test sa považuje za prijateľný, ak výsledkom pozitívnej kontroly je IVIS, ktoré patrí do rozsahu dvoch štandardných odchýlok aktuálneho historického priemeru, ktorý sa má aktualizovať aspoň každé tri mesiace, alebo vždy, keď sa vykoná nejaký prijateľný test v laboratóriách, v ktorých sa testy vykonávajú zriedkavo (t. j. menej ako raz za mesiac). Výsledkom reakcií negatívnej kontroly alebo kontroly rozpúšťadla/nosiča by mali byť hodnoty zákalu a priepustnosti, ktoré sú menšie ako stanovené horné medze hodnôt zákalu pozadia a priepustnosti pre hovädzie rohovky ovplyvnené príslušnou negatívnou kontrolou alebo kontrolou

▼M7

rozpúšťadla/nosiča. V prípade testovanej chemikálie s jednoznačnou výslednou klasifikáciou by malo byť postačujúce jedno testovanie, ktoré zahŕňa použitie aspoň troch rohoviek. Ak sa však pri prvom testovaní dosiahnu hraničné výsledky, malo by sa zvážiť druhé testovanie (no nevyžaduje sa nevyhnutne), ako aj tretie v prípade, že sa výsledky priemerného IVIS z prvých dvoch testovaní odlišujú. V tejto súvislosti sa výsledok prvého testovania pokladá za hraničný, ak predpoklady týkajúce sa troch rohoviek boli nesúhlasné tak, že:

— predpoklady týkajúce sa 2 z 3 rohoviek boli nesúhlasné v porovnaní s predpokladmi založenými na priemere všetkých 3 rohoviek, ALEBO

— predpoklad týkajúci sa 1 z 3 rohoviek bol nesúhlasný v porovnaní s predpokladom založeným na priemere všetkých 3 rohoviek A tento nesúhlasný výsledok bola hodnota > 10 jednotiek IVIS od hraničnej prahovej hodnoty 55.

— Ak sa opakovaným testovaním potvrdí predpoklad vychádzajúci z prvého testovania (na základe priemernej hodnoty IVIS), potom možno prijať konečné rozhodnutie bez ďalšieho testovania. Ak opakované testovanie vedie k predpokladu, ktorý je nesúhlasný v porovnaní s predpokladom vychádzajúcim z prvého testovania (na základe priemernej hodnoty IVIS), potom by sa malo vykonať tretie a konečné testovanie s cieľom vyriešiť rozdiely medzi predpokladmi a klasifikovať príslušnú testovanú chemikáliu. Upustenie od ďalšieho testovania na účely klasifikácie a označovania možno povoliť v prípade, že sa na základe ktoréhokoľvek testovania dospeje k predpokladu, že chemikália má byť zaradená do kategórie 1 GHS OSN.

Skúšobný protokol

Skúšobný protokol by mal obsahovať tieto informácie, ak sú relevantné pre vykonanie štúdie:

Testované a kontrolné chemikálie

— názov(-vy) chemikálie(-ií), ako je systémový názov, ktorý používa služba Chemical Abstracts Service (ďalej len „CAS“), a po ňom iné názvy, ak sú známe, registračné číslo CAS, ak je známe,

— čistota a zloženie testovanej/kontrolnej chemikálie (v hmotnostných percentách), pokiaľ je táto informácia k dispozícii,

— fyzikálno-chemické vlastnosti, ako je fyzikálny stav, prchavosť, pH, stabilita, chemická trieda, rozpustnosť vo vode, relevantné pre vykonanie štúdie,

— prípadná úprava testovaných/kontrolných chemikálií pred testovaním (napr. zahrievanie, drvenie),

— stabilita, ak je známa.

Informácie týkajúce sa objednávateľa a testovacieho zariadenia

— meno a adresa objednávateľa, testovacieho zariadenia a vedúceho štúdie.

Podmienky testovacej metódy

— použitý opacitometer (napr. model a špecifikácie) a nastavenia prístroja,

— informácie o kalibrácii pomôcok používaných na meranie zákalu a priepustnosti (napr. opacitometer a spektrofotometer) na zabezpečenie linearity meraní,

— typ použitých držiakov rohovky (napr. model a špecifikácie),

▼M7

— opis ďalšieho použitého vybavenia,

— postup použitý na zabezpečenie integrity (t. j. presnosti a spoľahlivosti) testovacej metódy priebežne (napr. pravidelné testovanie chemikálií na preukázanie spôsobilosti).

Kritériá na prijateľný test

— prijateľné rozsahy súbežných pozitívnych a negatívnych kontrol na základe historických údajov,

— prípadne prijateľné rozsahy súbežných referenčných kontrol na základe historických údajov.

Odber a príprava očí

— identifikácia zdroja očí (t. j. zariadenie, v ktorom sa vykonal ich odber),

— priemer rohovky ako meradlo veku zvieraťa, ktoré bolo zdrojom rohovky, a vhodnosti na danú skúšku,

— podmienky skladovania a dopravy očí (napr. dátum a čas odberu očí, časový interval pred začiatkom testovania, dopravné médiá a teplotné podmienky, akékoľvek použité antibiotiká),

— príprava a upevnenie hovädzích rohoviek vrátane vyhlásení o ich kvalite, teplota držiakov rohovky a kritériá výberu rohoviek používaných na testovanie.

Postup testu

— počet použitých replikátov,

— identita použitých negatívnych a pozitívnych kontrol (prípadne aj kontrola rozpúšťadla a referenčné kontroly),

— koncentrácia(-e) testovanej chemikálie, aplikácia, doba vystavenia a postexpozičná doba inkubácie,

— opis použitých hodnotiacich a rozhodovacích kritérií,

— opis použitých kritérií prijateľnosti štúdie,

— opis všetkých modifikácií testovacieho postupu,

— opis použitých rozhodovacích kritérií.

Výsledky

— údaje z individuálnych testovacích vzoriek spracované v podobe tabuľky [napr. hodnoty zákalu a OD490 a vypočítané hodnoty IVIS pre testovanú chemikáliu a pozitívne, negatívne a referenčné kontroly (ak sú zahrnuté) poskytnuté vo forme tabuľky vrátane prípadných údajov o opakovaných pokusoch s replikátmi, ako aj priemerné hodnoty ± štandardná odchýlka pri každom pokuse],

— opis ďalších pozorovaných účinkov,

— prípadne odvodená klasifikácia GHS OSN *in vitro*.

Diskusia o výsledkoch

Záver

▼**M7**

LITERATÚRA

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. Dostupné na: 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. Dostupné na: 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. Dostupné na: 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. Dostupné na: 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. Dostupné na: 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. Dostupné na: [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. Chapter B.5 of this Annex, Acute eye irritation/corrosion.

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. Dostupné na: [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).

Dostupné: na: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html.

▼M7

Dodatok 1

DEFINÍCIE

Presnosť: blízkosť zhody medzi výsledkami testovacej metódy a akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o meranie analytického výkonu testovacej metódy a jeden aspekt „relevantnosti“. Tento pojem sa často zamieňa s pojmom „zhoda“ na označenie podielu správnych výsledkov testovacej metódy.

Referenčná chemikália: chemikália, ktorá sa používa ako štandardná na porovnávanie s testovanou chemikáliou. Referenčná chemikália by mala mať tieto vlastnosti: i) konzistentný(-é) a spoľahlivý(-é) zdroj(-e); ii) štrukturálna a funkčná podobnosť s triedou chemikálií, ktoré sa testujú; iii) známe fyzikálno-chemické vlastnosti; iv) podporné údaje o známych účinkoch a v) známy potenciál v rozsahu želanej reakcie.

Prístup zdola nahor: prístup v postupných krokoch použitý v prípade chemikálie, o ktorej sa predpokladá, že nevyžaduje klasifikáciu ako chemikália spôsobujúca podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí. Začína odlíšením chemikálií nevyžadujúcich klasifikáciu (negatívny výsledok) od ostatných chemikálií (pozitívny výsledok).

Chemikália: látka alebo zmes.

Rohovka: priehľadná časť prednej strany očnej gule, ktorá pokrýva dúhovku a zrenicu a prepúšťa svetlo do vnútra oka.

Zákal rohovky: meranie rozsahu zakalenia rohovky po vystavení účinkom testovanej chemikálie. Zvýšený zákal rohovky je príznakom poškodenia rohovky. Zákal možno posudzovať subjektívne, ako napr. pomocou Draizovho očného testu na králikoch, alebo objektívne pomocou prístroja, ako je „opacitometer“.

Priepustnosť rohovky: kvantitatívne meranie poškodenia epitelu rohovky stanovením množstva farbiva fluoresceínu sodného, ktoré prejde cez všetky bunkové vrstvy rohovky.

Podráždenie očí: vyvolanie zmien v oku po aplikácii testovanej chemikálie na vonkajší povrch oka, ktoré sú do 21 dní po aplikácii úplne reverzibilné. Zamieňa sa s pojmami „reverzibilné účinky na oči“ a „kategória 2 GHS OSN“ (4).

Miera falošnej negativity: podiel všetkých pozitívnych chemikálií, ktoré sú na základe testovacej metódy nesprávne identifikované ako negatívne. Je to jeden ukazovateľ analytického výkonu testovacej metódy.

Miera falošnej pozitivity: podiel všetkých negatívnych chemikálií, ktoré sú na základe testovacej metódy nesprávne identifikované ako pozitívne. Je to jeden ukazovateľ analytického výkonu testovacej metódy.

Nebezpečnosť: inherentná vlastnosť činidla alebo situácia, ktorá má potenciál spôsobiť nepriaznivé účinky, ak sú organizmus, systém alebo populácia (subpopulácia) vystavené účinkom tohto činidla.

Skóre *in vitro* dráždivosti (IVIS): empiricky odvodený vzorec používaný v testovacej metóde zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky, v ktorom sa priemerná hodnota zákalu a priemerná hodnota priepustnosti v každej ovplyvnenej skupine spoja do jednej hodnoty (skóre) *in vitro*) ovplyvnenej skupiny. *IVIS* = priemerná hodnota zákalu + (15 × priemerná hodnota priepustnosti).

Ireverzibilné účinky na oči: pozri „vážne poškodenie očí“.

▼M7

Zmes: zmes alebo roztok pozostávajúce z dvoch alebo viacerých látok, ktoré v nej/ňom nereagujú (4).

Negatívna kontrola: neovplyvňovaný replikát, ktorý obsahuje všetky zložky testovacieho systému. Táto vzorka sa spracuje so vzorkami ovplyvnenými testovanou chemikáliou a s inými kontrolnými vzorkami s cieľom stanoviť, či rozpúšťadlo a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Neklasifikované: chemikálie, ktoré nie sú klasifikované v kategórii chemikálií spôsobujúcich podráždenie očí (kategória 2, 2A, alebo 2B GHS OSN) ani chemikálií spôsobujúcich vážne poškodenie očí (kategória 1 GHS OSN). Zamieňa sa s pojmom „bez kategórie v zmysle GHS OSN“.

Opacitometer: prístroj na meranie „zákalu rohovky“ kvantitatívnym vyhodnotením priepustnosti svetla cez rohovku. Typický prístroj má dve priehradky, z ktorých každá má vlastný zdroj svetla a fotobunku. Jedna priehradka sa používa na ovplyvnenú rohovku, zatiaľ čo druhá sa používa na kalibrovanie a vynulovanie prístroja. Svetlo z halogénovej lampy sa vyšle cez kontrolnú priehradku (prázdna komora bez okienok alebo kvapaliny) do fotobunky a porovná sa so svetlom vyslaným do fotobunky cez testovaciu priehradku, v ktorej je umiestnená komora s rohovkou. Rozdiel v priepustnosti svetla z fotobuniek sa porovná a na číslicovom displeji sa ukáže číselná hodnota zákalu.

Pozitívna kontrola: replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému a ovplyvnený chemikáliou, o ktorej je známe, že vyvoláva pozitívnu reakciu. S cieľom zabezpečiť možnosť posudzovať variabilitu reakcie pozitívnej kontroly v priebehu času by rozsah pozitívnej reakcie nemal byť nadmerne veľký.

Reverzibilné účinky na oči: pozri „podráždenie očí“.

Spoľahlivosť: merania rozsahu, v rámci ktorého môže byť testovacia metóda v priebehu určitého času reprodukovateľná v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, keď sa používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti a medzilaboratórnej opakovateľnosti.

Vážne poškodenie očí: vyvolanie poškodenia tkaniva oka alebo vážneho fyzického zhoršenia zraku po aplikácii testovanej chemikálie na vonkajší povrch oka, ktoré nie je úplne reverzibilné do 21 dní po aplikácii. Zamieňa sa s pojmami „ireverzibilné účinky na oči“ a „kategória 1 GHS OSN“ (4).

Kontrola rozpúšťadla/nosiča: neovplyvnená vzorka, ktorá obsahuje všetky zložky testovacieho systému vrátane rozpúšťadla alebo nosiča a ktorá sa spracúva so vzorkami ovplyvnenými testovanou chemikáliou a s inými kontrolnými vzorkami, aby sa zistila základná reakcia vzoriek ovplyvnených testovanou chemikáliou rozpustenou v tom istom rozpúšťadle alebo nosiči. Keď sa táto vzorka testuje so súbežnou negatívnou kontrolou, preukazuje aj to, či rozpúšťadlo alebo nosič na seba s testovacím systémom navzájom pôsobia.

Látka: chemické prvky a ich zlúčeniny v prirodzenom stave alebo získané akýmkoľvek procesom výroby vrátane akejkoľvek prísady potrebnej na udržanie stability produktu a akýchkoľvek nečistôt vzniknutých v použitom procese, ale s výnimkou každého rozpúšťadla, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo zmeny jej zloženia (4).

Povrchovo aktívna látka: takisto nazývaná surfaktant, je látka, ako napríklad detergent, ktorá dokáže znížiť povrchové napätie kvapaliny, a tak jej umožniť penenie alebo prenikanie do tuhých látok. Nazýva sa aj zvlhčujúce činidlo.

▼M7

Zmes obsahujúca povrchovo aktívne látky: v kontexte tejto testovacej metódy je to zmes obsahujúca jednu alebo viac povrchovo aktívnych látok s konečnou koncentráciou > 5 %.

Prístup zhora nadol: prístup v postupných krokoch použitý v prípade chemikálie, o ktorej sa predpokladá, že spôsobuje vážne poškodenie očí. Začína odlíšením chemikálií spôsobujúcich vážne poškodenie očí (pozitívny výsledok) od ostatných chemikálií (negatívny výsledok).

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Stratégia viacúrovňového testovania: stratégia postupného testovania, pri ktorej sa v presne určenom poradí na každej úrovni preskúmavajú všetky existujúce informácie o testovanej chemikálii pomocou analýzy váhy dôkazov s cieľom zistiť, či sú dostupné dostatočné informácie na to, aby sa mohlo prijať rozhodnutie o klasifikácii nebezpečnosti pred tým, ako sa postúpi na ďalšiu úroveň. Ak možno testovanej chemikálii na základe existujúcich informácií pripísať potenciál spôsobiť podráždenie, nevyžaduje sa ďalšie testovanie. Ak na základe existujúcich informácií nemožno testovanej chemikálii pripísať potenciál spôsobiť podráždenie očí, použije sa prístup postupného testovania na zvieratách v jednotlivých krokoch, až kým nebude možná jednoznačná klasifikácia.

Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií (GHS) Organizácie spojených národov (OSN): systém navrhujúci klasifikáciu chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálnych, zdravotných a enivornmentálnych nebezpečností a ich označovanie zodpovedajúcimi komunikačnými prvkami, ako sú piktogramy, výstražné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o nepriaznivých účinkoch daných chemikálií v záujme ochrany osôb (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a subjektov reakcie na núdzové situácie) a životného prostredia (4).

Kategória 1 GHS OSN: pozri „vážne poškodenie očí“.

Kategória 2 GHS OSN: pozri „podráždenie očí“.

Bez kategórie v zmysle GHS OSN: chemikálie, ktoré nespĺňajú požiadavky na klasifikáciu ako chemikálie kategórie 1 alebo 2 (2A alebo 2B) GHS OSN. Zamieňa sa s pojmom „neklasifikované“.

Validovaná testovacia metóda: testovacia metóda, v prípade ktorej sa vykonali validačné štúdie s cieľom určiť relevantnosť (vrátane presnosti) a spoľahlivosť na konkrétny účel. Je dôležité poznamenať, že validovaná testovacia metóda nemusí poskytnúť postačujúci analytický výkon z hľadiska presnosti a spoľahlivosti, aby bola prijateľná pre navrhovaný účel.

Analýza váhy dôkazov: postup posudzovania silných a slabých stránok rôznych informácií na dosiahnutie a podporu záveru, pokiaľ ide o potenciál nebezpečnosti testovanej chemikálie.

▼M7

Dodatok 2

PREDIKTÍVNA SCHOPNOSŤ TESTOVACEJ METÓDY ZÁKALU A PRIEPUSTNOSTI HOVÄDZEJ ROHOVKY

Tabuľka 1

Prediktívna schopnosť testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky, pokiaľ ide o identifikáciu chemikálií vyvolávajúcich vážne poškodenie očí [kategória 1 GHS OSN/EÚ CLP v. iné ako kategória 1 (kategória 2 + bez kategórie); kategória I US EPA v. iné ako kategória I (kategória II + kategória III + kategória IV)]

Klasifikačný systém	Počet	Presnosť		Citlivosť		Falošné negatívne výsledky		Špecifickosť		Falošné pozitívne výsledky	
		%	Počet	%	Počet	%	Počet	%	Počet	%	Počet
GHS OSN EÚ CLP	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
US EPA	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Tabuľka 2

Prediktívna schopnosť testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky, pokiaľ ide o identifikáciu chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí („nedráždivé látky“) [bez kategórie GHS OSN/EÚ CLP v. nie bez kategórie (kategória 1 + kategória 2); kategória IV US EPA v. iné ako kategória IV (kategória I + kategória II + kategória III)]

Klasifikačný systém	Počet	Presnosť		Citlivosť		Falošné negatívne výsledky		Špecifickosť		Falošné pozitívne výsledky	
		%	Počet	%	Počet	%	Počet	%	Počet	%	Počet
GHS OSN EÚ CLP	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
US EPA	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

▼M7

Dodatok 3

CHEMIKÁLIE NA PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI VYKONÁVAŤ TESTOVACIU METÓDU ZÁKALU A PRIEPUSTNOSTI HOVÄDZEJ ROHOVKY

Pred rutinným použitím tejto testovacej metódy by laboratóriá mali preukázať technickú spôsobilosť tak, že správne určia klasifikáciu nebezpečnosti pre oči v prípade 13 chemikálií odporúčaných v tabuľke 1. Tieto chemikálie boli vybraté tak, aby predstavovali rozsah reakcií na nebezpečnosti pre oči na základe výsledkov očného testu *in vivo* na králikoch (TG 405) (17) a klasifikačného systému GHS OSN (t. j. kategórie 1, 2A, 2B alebo neklasifikované) (4). Ďalším kritériom výberu bola komerčná dostupnosť chemikálií, dostupnosť vysoko kvalitných referenčných údajov *in vivo* a dostupnosť vysoko kvalitných údajov z testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky *in vitro*. Referenčné údaje sú dostupné v skrátenom súhrnnom dokumente (Streamlined Summary Document) (3) a v podkladovom kontrolnom dokumente (Background Review Document) ICCVAM pre testovaciu metódu zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky (2)(18).

Tabuľka 1

Odporúčané chemikálie na preukazovanie technickej spôsobilosti na vykonávanie testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky

Chemikália	CAS číslo	Chemická trieda ([1])	Fyzikálna forma	Klasifikácia *in vivo* ([2])	Klasifikácia na základe testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky
Benzalkónium chlorid (5 %)	8001-54-5	óniová zlúčenina	kvapalina	kategória 1	kategória 1
Chlórhexidín	55-56-1	amín, amidín	tuhá látka	kategória 1	kategória 1
Kyselina dibenzoyl-L-vínna	2743-38-6	karboxylová kyselina, ester	tuhá látka	kategória 1	kategória 1
Imidazol	288-32-4	heterocyklická zlúčenina	tuhá látka	kategória 1	kategória 1
Kyselina trichlóroctová (30 %)	76-03-9	karboxylová kyselina	kvapalina	kategória 1	kategória 1
2,6-dichlórbenzoyl chlorid	4659-45-4	acylhalogenid	kvapalina	kategória 2A	nie je možný presný/spoľahlivý predpoklad
Etyl-2-metylacetoacetát	609-14-3	ketón, ester	kvapalina	kategória 2B	nie je možný presný/spoľahlivý predpoklad
Dusičnan amónny	6484-52-2	anorganická soľ	tuhá látka	kategória 2 ([3])	nie je možný presný/spoľahlivý predpoklad
EDTA, di-draselná soľ	25102-12-9	Amín, karboxylová kyselina (soľ)	tuhá látka	neklasifikované	neklasifikované
Tween 20	9005-64-5	Ester, polyéter	kvapalina	neklasifikované	neklasifikované
2-merkaptopyrimidín	1450-85-7	acylhalogenid	tuhá látka	neklasifikované	neklasifikované
Fenylbutazón	50-33-9	heterocyklické zlúčeniny	tuhá látka	neklasifikované	neklasifikované

▼**M7**

Chemikália	CAS číslo	Chemická trieda ([1])	Fyzikálna forma	Klasifikácia *in vivo* ([2])	Klasifikácia na základe testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky
Polyoxyetylén 23 lauryl éter (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	alkohol	kvapalina	neklasifikované	neklasifikované

Skratky: CAS číslo = registračné číslo CAS (Chemical Abstracts Service)

([1]) Chemické triedy boli stanovené pre každú testovanú chemikáliu s použitím štandardnej klasifikačnej schémy na základe klasifikačného systému National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (dostupné na http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Na základe výsledkov očného testu na králikoch in vivo (OECD TG 405) (17) a s použitím GHS OSN (4).

([3]) Klasifikácia v kategóriách 2A alebo 2B závisí od interpretácie kritéria GHS OSN pre rozlišovanie medzi týmito dvoma kategóriami, t. j. 1 z 3 v. 2 z 3 zvierat s účinkami v deň 7 potrebnými na klasifikáciu v kategórii 2A. Do štúdie *in vivo* boli zahrnuté 3 zvieratá. Všetky sledované parametre s výnimkou začervenania spojoviek v prípade jedného zvieraťa sa do dňa 7 alebo skôr vrátili na nulovú hodnotu. Toto jedno zviera, ktoré sa do dňa 7 v plnej miere nezotavilo, vykazovalo (v deň 7) začervenanie spojoviek s hodnotou 1, ktorá sa v deň 10 úplne vrátila na pôvodnú hodnotu.

▼M7

Dodatok 4

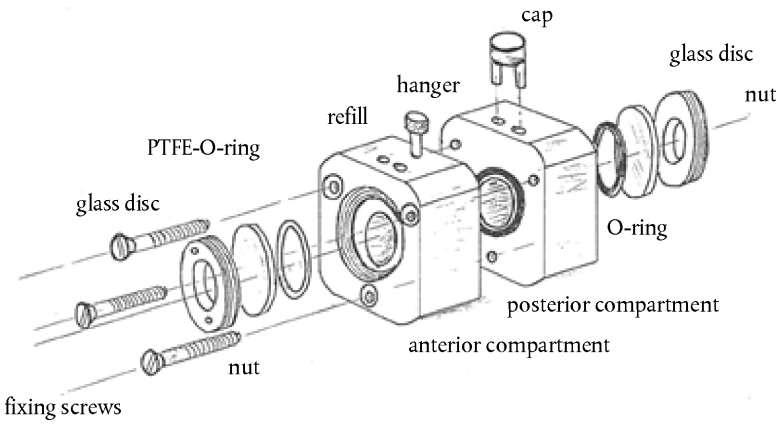
DRŽIAK ROHOVKY TESTOVACEJ METÓDY ZÁKALU A PRIEPUSTNOSTI HOVÄDZEJ ROHOVKY

Držiaky rohoviek testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky sú vyrobené z inertného materiálu (napr. z polypropylénu). Držiaky sa skladajú z dvoch polovíc (prednej a zadnej komory) a majú dve podobné valcovité vnútorné komory. Každá komora je navrhnutá tak, aby obsiahla objem 5 ml a je ukončená skleneným okienkom, cez ktoré sa zaznamenávajú namerané údaje zákalu. Každá vnútorná komora má priemer 1,7 cm a hĺbku 2,2 cm ([1]). Proti presakovaniu sa používa tesniaci krúžok umiestnený na zadnej komore. Rohovky sa umiestňujú endotelovou stranou nadol na tesniaci krúžok zadných komôr a predné komory sa umiestnia na epitelovú stranu rohoviek. Komory sú zafixované na mieste tromi nehrdzavejúcimi skrutkami nachádzajúcimi sa na vonkajších okrajoch komory. Na konci každej komory je sklenené okienko, ktoré sa môže vybrať, aby sa zabezpečil ľahší prístup k rohovke. Tesniaci krúžok sa takisto nachádza medzi skleneným okienkom a komorou, aby bránil presakovaniu. Dva otvory na vrchnej strane každej komory umožňujú zavedenie a odstránenie média a testovaných chemikálií. V čase ovplyvňovania a inkubácie sú uzavreté gumovými uzávermi. Priepustnosť svetla držiakmi rohovky sa potenciálne môže zmeniť, keďže účinky opotrebovania alebo akumulácie špecifických chemických rezíduí na otvoroch vnútornej strany komory alebo na sklenených okienkach môžu ovplyvniť rozptyl alebo odraz svetla. Dôsledkom by mohla byť zvýšená alebo znížená priepustnosť základného svetla (a teda zníženie alebo zvýšenie odčítaných základných údajov o zákale) cez držiaky rohoviek, ktoré môže byť viditeľné ako markantné zmeny v očakávaných základných počiatočných meraniach zákalu rohovky v jednotlivých komorách (t. j. počiatočné hodnoty zákalu rohovky sa v určitých jednotlivých držiakoch rohoviek môžu rutinne líšiť o viac než 2 alebo 3 zákalové jednotky od očakávaných základných hodnôt). Každé laboratórium by malo zvážiť zavedenie programu na hodnotenie zmien v priepustnosti svetla cez držiaky rohoviek, a to v závislosti od povahy chemického zloženia testovaných látok a od frekvencie používania komôr. S cieľom stanoviť základné hodnoty sa držiaky rohoviek môžu pred rutinným použitím skontrolovať tak, že sa odmerajú základné hodnoty zákalu (alebo priepustnosť svetla) komôr naplnených kompletným médiom, bez rohoviek. Držiaky rohoviek sa následne pravidelne kontrolujú, či počas používania nenastali zmeny v priepustnosti svetla. Každé laboratórium si môže stanoviť frekvenciu kontrol držiakov rohoviek na základe testovaných chemikálií, frekvenciu používania a pozorovaní zmien v základných hodnotách zákalu rohoviek. Ak sa spozorujú markantné zmeny v priepustnosti svetla cez držiaky rohoviek, je potrebné zvážiť vhodné vyčistenie a/alebo vyleštenie vnútorného povrchu držiakov rohoviek alebo ich výmenu.

([1]) Uvedené rozmery vychádzajú z držiaka rohovky, ktorý sa používa v prípade kráv vo veku od 12 do 60 mesiacov. V prípade, že sa používajú zvieratá vo veku 6 až 12 mesiacov, držiak by sa musel navrhnúť tak, aby každá komora obsiahla objem 4 ml a aby každá vnútorná komora mala priemer 1,5 cm a hĺbku 2,2 cm. Pri novom návrhu držiaka rohovky je veľmi dôležité, aby pomer vystavenej plochy povrchu rohovky k objemu zadnej komory bol taký istý ako tento pomer v prípade tradičného držiaka rohovky. Je to potrebné na to, aby sa zabezpečilo správne určenie hodnôt priepustnosti na výpočet IVIS podľa navrhnutého vzorca.

▼M7

Držiak rohovky: rozvinutý diagram



▼M7

Dodatok 5

OPACITOMETER

Opacitometer je prístroj na meranie priepustnosti svetla. Napríklad v prípade zariadenia OP-KIT od výrobcu Electro Design (Riom, Francúzsko) používaného na validáciu testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky sa svetlo z halogénovej lampy vyšle cez kontrolnú priehradku (prázdna komora bez okienok alebo kvapaliny) do fotobunky a porovná sa so svetlom vyslaným do fotobunky cez testovaciu priehradku, v ktorej je umiestnená komora s rohovkou. Rozdiel v priepustnosti svetla z fotobuniek sa porovná a na číslicovom displeji sa ukáže číselná hodnota zákalu. Stanovia sa zákalové jednotky. Môžu sa používať aj iné typy opacitometrov s odlišným nastavením (napr. nevyžadujúce si paralelné merania kontrolnej a testovacej priehradky), ak sa dokáže, že vedú k podobným výsledkom ako validované zariadenie.

Opacitometer by mal poskytovať lineárnu reakciu pomocou radu údajov o zákale, ktoré pokrývajú hraničné hodnoty používané pre rôzne klasifikácie opísané v prediktívnom modeli (t. j. až po hraničnú hodnotu určujúcu žieravosť/silnú dráždivosť). V snahe zabezpečiť lineárne a presné odčítanie údajov až do 75 – 80 zákalových jednotiek je potrebné vykonať kalibráciu opacitometra s použitím súboru kalibrátorov. Kalibrátory sa vložia do kalibračnej komory (komora na rohovku určená na držanie kalibrátorov) a odčíta sa údaj na opacitometri. Kalibračná komora je navrhnutá tak, aby kalibrátory boli v nej uložené približne v rovnakej vzdialenosti medzi svetlom a fotobunkou, ako by boli uložené rohovky počas meraní zákalu. Referenčné hodnoty a počiatočný nastavený bod závisia od typu použitého zariadenia. Linearita meraní zákalu by sa mala zabezpečiť vhodnými postupmi (špecifickými pre konkrétny prístroj). Napríklad v prípade zariadenia OP-KIT od výrobcu Electro Design (Rion, Francúzsko) sa opacitometer najprv kalibruje na hodnotu 0 zákalových jednotiek s použitím kalibračnej komory bez kalibrátora. Potom sa do kalibračnej komory vložia tri rôzne kalibrátory jeden po druhom a odmerajú sa zákaly. Výsledkom meraní s kalibrátormi 1, 2 a 3 by mali byť údaje o zákale, ktoré sa rovnajú ich nastaveným hodnotám 75, 150 a 225 zákalových jednotiek v uvedenom poradí ± 5 %.

▼M7

B.48. TESTOVACIA METÓDA IZOLOVANÉHO KURACIEHO OKA NA IDENTIFIKÁCIU I) CHEMIKÁLIÍ VYVOLÁVAJÚCICH VÁŽNE POŠKODENIE OČÍ A II) CHEMIKÁLIÍ, KTORÉ SI NEVYŽADUJÚ KLASIFIKÁCIU AKO CHEMIKÁLIE SPÔSOBUJÚCE PODRÁŽDENIE OČÍ ALEBO VÁŽNE POŠKODENIE OČÍ

ÚVOD

Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 438 (2013). Testovaciu metódu izolovaného kuracieho oka ohodnotil Medziagentúrny koordinačný výbor pre validáciu alternatívnych metód (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) v spojení s Európskym centrom pre validáciu alternatívnych metód (European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM) a Japonským centrom pre validáciu alternatívnych metód (Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods, JaCVAM) v rokoch 2006 a 2010 (1) (2) (3). Pri prvom hodnotení bola testovacia metóda izolovaného kuracieho oka schválená ako vedecky platná testovacia metóda na používanie ako skrínigový test na identifikáciu chemikálií (látok a zmesí), ktoré vyvolávajú vážne poškodenie očí (kategória 1) podľa Globálneho harmonizovaného systému klasifikácie a označovania chemikálií (GHS) Organizácie Spojených národov (OSN) (1) (2) (4) a nariadenia (ES) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (nariadenie CLP) ([1]). V druhom hodnotení bola testovacia metóda izolovaného kuracieho oka hodnotená z hľadiska používania ako skríningový test na identifikáciu chemikálií, ktoré nie sú klasifikované ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí podľa GHS OSN (3) (4). Výsledky validačnej štúdie a odporúčaní výboru pre partnerské preskúmanie potvrdili pôvodné odporúčanie týkajúce sa používania testovacej metódy izolovaného kuracieho oka na klasifikáciu chemikálií, ktoré vyvolávajú vážne poškodenie očí (kategória 1 GHS OSN), keďže dostupná databáza zostala nezmenená od pôvodnej validácie ICCVAM. V tomto štádiu neboli navrhnuté ďalšie odporúčania, pokiaľ ide o rozšírenie oblasti uplatniteľnosti testovacej metódy izolovaného kuracieho oka tak, aby zahŕňala iné kategórie. Prehodnotenie súboru údajov *in vitro* a *in vivo* použitých vo validačnej štúdii sa vykonalo so zameraním na vyhodnotenie užitočnosti testovacej metódy izolovaného kuracieho oka na účely identifikácie chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí (5). V závere tohto prehodnotenia sa uvádza, že testovaciu metódu izolovaného kuracieho oka možno takisto použiť na identifikáciu chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí podľa klasifikácie GHS OSN (4) (5). Táto testovacia metóda zahŕňa odporúčané použitia a obmedzenia testovacej metódy izolovaného kuracieho oka na základe týchto hodnotení. Hlavné rozdiely medzi pôvodnou verziou usmernenia OECD na vykonávanie testov z roku 2009 a jeho aktualizovanou verziou z roku 2013 sa okrem iného vzťahujú na používanie testovacej metódy izolovaného kuracieho oka na identifikáciu chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu podľa klasifikačného systému GHS OSN, aktualizáciu prvkov skúšobného protokolu, aktualizáciu dodatku 1, pokiaľ ide o definície, a aktualizáciu dodatku 2, pokiaľ ide o chemikálie na preukázanie spôsobilosti.

V súčasnosti sa všeobecne uznáva, že v dohľadnej budúcnosti nedokáže ani jeden *in vitro* test očnej dráždivosti nahradiť Draizov *in vivo* očný test tak, aby sa dal predpokladať celý rad podráždení pri rôznych chemických triedach. Draizov očný test (6) však možno dokážu nahradiť strategické kombinácie niekoľkých alternatívnych testovacích metód v rámci (viacúrovňovej) testovacej stratégie. Prístup zhora nadol (7) sa má uplatiť vtedy, keď sa na základe existujúcich informácií očakáva, že chemikália má veľký potenciál dráždivých účinkov,

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 z o16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006, Ú. v. EÚ L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼M7

zatiaľ čo prístup zdola nahor (7) sa má použiť vtedy, keď sa na základe existujúcich informácií očakáva, že chemikália nedráždi oči v dostatočnej miere na to, aby si vyžadovala klasifikáciu. Testovacia metóda izolovaného kuracieho oka je testovacia metóda *in vitro*, ktorú možno použiť za určitých okolností a so špecifickými obmedzeniami opísanými v bodoch 8 až 10 na klasifikáciu chemikálií z hľadiska ich nebezpečnosti pre oči a na ich označovanie. Hoci sa testovacia metóda izolovaného kuracieho oka nepokladá za platnú ako samostatná náhrada za očný test *in vivo* na králikoch, odporúča sa ako úvodný krok v testovacej stratégii, ako je prístup zhora nadol, ktorý odporúča Scott *et al.* (7) na identifikáciu chemikálií vyvolávajúcich vážne poškodenie očí, t. j. chemikálií, ktoré sa majú klasifikovať ako chemikálie kategórie 1 GHS OSN bez ďalšieho testovania (4). Testovacia metóda izolovaného kuracieho oka sa takisto odporúča na identifikáciu chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí podľa definície GHS OSN (bez kategórie) (4) a môže sa preto používať ako prvý krok v rámci prístupu testovacej stratégie zdola nahor (7). Chemikália, o ktorej sa na základe testovacej metódy izolovaného kuracieho oka nepredpokladá, že spôsobí vážne poškodenie očí alebo že nebude klasifikovaná ako chemikália spôsobujúca podráždenie/vážne poškodenie očí, by si však na stanovenie konečnej klasifikácie vyžadovala ďalšie testovanie (*in vitro* a/alebo *in vivo*). Okrem toho by sa pred použitím testovacej metódy izolovaného kuracieho oka v rámci prístupu zdola nahor podľa iných klasifikačných schém než GHS OSN malo konzultovať s príslušnými regulačnými orgánmi.

Cieľom tejto testovacej metódy je opísať postupy používané na hodnotenie potenciálu testovanej chemikálie predstavovať nebezpečnosť pre oči, a to na základe merania jej schopnosti vyvolať alebo nevyvolať toxicitu v odobratom kuracom oku. Toxické účinky na rohovku sa merajú i) kvalitatívnym posúdením zákalu, ii) kvalitatívnym posúdením poškodenia epitelu na základe aplikácie fluoresceínu do oka (zadržiavanie fluoresceínu), iii) kvantitatívnym meraním zväčšenej hrúbky (opuchu) a iv) kvalitatívnym vyhodnotením makroskopického morfologického poškodenia povrchu. Posúdenie zákalu, opuchu a poškodenia rohovky po vystavení účinkom testovanej chemikálie sa hodnotia jednotlivo a potom sa zlúčia a odvodí sa klasifikácia očnej dráždivosti.

Definície sa uvádzajú v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

Táto testovacia metóda vychádza z protokolu navrhnutého v usmerneňovacom dokumente OECD na vykonávanie testov 160 (8), ktorý bol vypracovaný podľa medzinárodnej validačnej štúdie ICCVAM (1) (3) (9) s príspevkami od Európskeho centra pre validáciu alternatívnych metód, Japonského centra pre validáciu alternatívnych metód a z Odboru toxikológie a aplikovanej farmakológie Organizácie pre aplikovaný prírodovedecký výskum pre kvalitu života (ďalej len „TNO“) (Holandsko). Tento protokol vychádza z informácií získaných zo zverejnených protokolov, ako aj z aktuálneho protokolu, ktorý používa TNO (10) (11) (12) (13) (14).

V rámci validácie, ktorá je základom tejto testovacej metódy, bol otestovaný celý rad chemikálií a empirická databáza validačnej štúdie obsahovala 152 chemikálií, z toho 72 látok a 80 zmesí (5). Testovacia metóda je uplatniteľná na tuhé látky, kvapaliny, emulzie a gély. Kvapaliny môžu byť vodné alebo nevodné; tuhé látky môžu byť rozpustné alebo nerozpustné vo vode. Plyny a aerosóli ešte neboli vo validačnej štúdii hodnotené.

Testovaciu metódu izolovaného kuracieho oka možno použiť na identifikáciu chemikálií vyvolávajúcich vážne poškodenie očí, t. j. chemikálií, ktoré sa majú klasifikovať ako kategória 1 GHS OSN (4). Pri používaní na tento účel sú zistené obmedzenia testovacej metódy izolovaného kuracieho oka založené na vysokých mierach falošnej pozitivity pri alkoholoch a vysokých mierach falošnej negativity pri tuhých látkach a povrchovo aktívnych látkach (1) (3) (9). Miery falošnej negativity v tejto súvislosti (kategória 1 GHS OSN neidentifikovaná ako kategória 1 GHS OSN) však nie sú rozhodujúce, keďže všetky testované chemikálie,

▼M7

ktoré majú negatívny výsledok, by sa následne testovali pomocou iného(-ých) adekvátne validovaného(-ých) *in vitro* testu(-ov), alebo – ako posledná možnosť – na králikoch, v závislosti od regulačných požiadaviek pomocou stratégie postupného testovania v rámci analýzy váhy dôkazov. Malo by sa poznamenať, že tuhé látky môžu spôsobiť premenlivé a extrémne podmienky expozície pri Draizovom *in vivo* teste očnej dráždivosti, čo môže viesť k nerelevantným predpokladom týkajúcim sa ich skutočného potenciálu spôsobiť podráždenie (15). Výskumní pracovníci by mohli zvážiť použitie tejto testovacej metódy v prípade všetkých typov chemikálií, pri ktorých by sa mal pozitívny výsledok prijať ako indikátor vážneho poškodenia očí, t. j. kategória 1 GHS OSN bez ďalšieho testovania. Pozitívne výsledky získané s použitím alkoholov by sa však mali interpretovať opatrene, keďže existuje riziko nadhodnoteného predpokladu.

Keď sa testovacia metóda izolovaného kuracieho oka používa na identifikáciu chemikálií vyvolávajúcich vážne poškodenie očí (kategória 1 GHS OSN), vykazuje celkovú presnosť 86 % (120/140), mieru falošnej pozitivity 6 % (7/113), a mieru falošnej negativity 48 % (13/27) v porovnaní s údajmi o metóde očného testu *in vivo* na králikoch s klasifikáciou podľa klasifikačného systému GHS OSN (4) (5).

Testovaciu metódu izolovaného kuracieho oka možno takisto použiť na identifikáciu chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí podľa klasifikačného systému GHS OSN (4). Pred použitím testovacej metódy izolovaného kuracieho oka v rámci prístupu zdola nahol podľa iných klasifikačných schém by sa malo konzultovať s príslušnými regulačnými orgánmi. Túto testovaciu metódu možno použiť v prípade všetkých typov chemikálií, pričom by sa mohol prijať negatívny výsledok a neklasifikovať chemikáliu ako chemikáliu spôsobujúcu podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí. Na základe jedného výsledku z validačnej databázy však môže v prípade antivegetatívnych farieb obsahujúcich organické rozpúšťadlá dôjsť k podhodnotenému predpokladu (5).

Keď sa testovacia metóda izolovaného kuracieho oka používa na identifikáciu chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí, vykazuje celkovú presnosť 82 % (125/152), mieru falošnej pozitivity 33 % (26/79), a mieru falošnej negativity 1 % (1/73) v porovnaní s údajmi o metóde očného testu *in vivo* na králikoch s klasifikáciou podľa klasifikačného systému GHS OSN (4) (5). Keď sa testované chemikálie v rámci určitých tried (t. j. antivegetatívne farby obsahujúce organické rozpúšťadlá) vylúčia z databázy, testovacia metóda izolovaného kuracieho oka vykazuje podľa klasifikačného systému GHS OSN presnosť 83 % (123/149), mieru falošnej pozitivity 33 % (26/78), a mieru falošnej negativity 0 % (0/71) (4) (5).

Testovacia metóda izolovaného kuracieho oka sa neodporúča na identifikáciu testovaných chemikálií, ktoré by sa mali klasifikovať ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí (t. j. kategória 2 alebo kategória 2A GHS OSN) alebo testovaných chemikálií, ktoré by sa mali klasifikovať ako chemikálie spôsobujúce mierne podráždenie očí (kategória 2B GHS OSN) vzhľadom na značné množstvo chemikálií kategórie 1 GHS OSN, ktoré sú zaradené do príliš nízkej kategórie, ako napr. kategória 2, 2A alebo 2B GHS OSN a chemikálií bez kategórie v zmysle GHS OSN, ktoré sú zaradené do príliš vysokej kategórie, ako napr. kategória 2, 2A alebo 2B GHS OSN. Na tento účel sa môže vyžadovať ďalšie testovanie pomocou inej vhodnej metódy.

Všetky postupy, pri ktorých sa používajú kuracie oči, by mali byť v súlade s platnými nariadeniami a postupmi vzťahujúcimi sa na dané testovacie zariadenie v oblasti zaobchádzania s materiálom živočíšneho pôvodu (ľudského alebo zvieracieho), medzi ktoré okrem iného patria tkanivá a tkanivové tekutiny. Odporúčajú sa všeobecne platné laboratórne bezpečnostné opatrenia (16).

Zatiaľ čo pri testovacej metóde izolovaného kuracieho oka sa nezohľadňujú spojovkové a dúhovkové poškodenia, ktoré sa hodnotia v testovacej metóde očnej dráždivosti na králikoch, zohľadňujú sa v nej účinky na rohovku, ktoré sú hlavným faktorom klasifikácie *in vivo* pri klasifikácii v zmysle GHS OSN. Takisto je potrebné uviesť, že hoci sa reverzibilita lézií rohovky nemôže v testovacej metóde izolovaného kuracieho oka posudzovať ako taká, na základe štúdií

▼M7

očí králikov sa navrhlo, aby sa posúdenie počiatočnej hĺbky poškodenia rohovky mohlo používať na zistenie niektorých typov irevezibilných účinkov (17). Na porozumenie toho, ako môžu vzniknúť ireverzibilné účinky, ktoré nesúvisia s počiatočným vysokým stupňom poškodenia, sú potrebné najmä ďalšie vedecké poznatky. Testovacia metóda izolovaného kuracieho oka v konečnom dôsledku neumožňuje posúdenie potenciálu systémovej toxicity súvisiacej s vystavením očí.

Táto testovacia metóda sa bude s prehodnocovaním nových informácií a údajov pravidelne aktualizovať. Napríklad v prípade potreby ucelenejšej charakteristiky poškodenia rohovky by mohla byť užitočná histopatológia. Na vyhodnotenie tejto možnosti sa používateľom odporúča uchovať oči a pripraviť histopatologické vzorky, ktoré možno použiť na vytvorenie databázy a zavedenie rozhodovacích kritérií, ktoré môžu ďalej zlepšiť presnosť tejto testovacej metódy. OECD vypracovala usmerňujúci dokument o používaní testovacích metód *in vitro* na hodnotenie očnej toxicity, ktorý zahŕňa podrobné postupy odberu vzoriek na histopatológiu a informácie o tom, kde treba vzorky a/alebo údaje z histopatológie predkladať (8).

V každom laboratóriu, ktoré zavádza túto skúšku, by sa mali použiť chemikálie na preukázanie spôsobilosti uvedené v dodatku 2. Laboratórium môže použiť tieto chemikálie na účely preukázania svojej odbornej spôsobilosti na vykonávanie testovacej metódy izolovaného kuracieho oka pred predložením údajov o testovacej metóde izolovaného kuracieho oka na regulačné účely klasifikácie nebezpečnosti.

PRINCÍP TESTU

Testovacia metóda izolovaného kuracieho oka predstavuje organotypický model, ktorý poskytuje krátkodobé uchovanie kuracieho oka *in vitro*. Pri tejto testovacej metóde sa poškodenie testovanou chemikáliou posudzuje zistením opuchu, zákalu rohovky a zadržiavania fluoresceínu. Zatiaľ čo zákal rohovky a zadržiavanie fluoresceínu si vyžadujú kvalitatívne hodnotenie, analýza opuchu rohovky predstavuje kvantitatívne hodnotenie. Každé meranie sa buď prevedie na kvantitatívnu hodnotu, ktorá sa použije na výpočet celkového ukazovateľa podráždenia, alebo sa mu priradí kvalitatívna kategorizácia, ktorá sa použije na stanovenie klasifikácie nebezpečnosti pre oči *in vitro* buď ako kategória 1 GHS OSN alebo bez klasifikácie v zmysle GHS OSN. Oba uvedené výsledky možno potom použiť na predpoklad potenciálu testovanej chemikálie spôsobiť vážne poškodenie očí *in vivo* alebo správať sa ako chemikália, ktorá si nevyžaduje klasifikáciu ako chemikália predstavujúca nebezpečnosť pre oči (pozri rozhodovacie kritériá). V prípade chemikálií, o ktorých sa nepredpokladá, že spôsobujú vážne poškodenie očí, alebo že nebudú pomocou testovacej metódy izolovaného kuracieho oka klasifikované, sa však nemôže vykonať klasifikácia (pozri bod 11).

Zdroj a vek kuracích očí

Historicky sa na túto skúšku používajú oči získané z kurčiat z bitúnkov, kde sa usmrcujú na ľudskú spotrebu, čím sa odstránila potreba laboratórnych zvierat. Používajú sa iba oči zo zdravých zvierat, ktoré sa považujú za vhodné na vstup do ľudského potravinového reťazca.

Hoci sa ešte nevykonala kontrolovaná štúdia na posúdenie optimálneho veku kurčiat, vek a hmotnosť kurčiat, ktoré sa historicky používajú v tejto testovacej metóde, zodpovedajú veku a hmotnosti jarných kurčiat spracovávaných tradične na hydinových bitúnkoch (t. j. približne 7 týždňové, 1,5 – 2,5 kg).

Odber a doprava očí do laboratória

Hlavy by sa mali sňať hneď po znehybnení kurčiat – zvyčajne elektrickým šokom a narezaním krku s následným vykrvácaním. Miestny zdroj kurčiat v blízkosti laboratória by mal byť umiestnený tak, aby sa hlavy mohli dopraviť z bitúnka do laboratória dostatočne rýchlo, čím sa minimalizuje ich znehodnotenie a/alebo kontaminácia baktériami. Časový interval medzi získaním kuracích hláv a vložením očí po ich odobratí do superfúznej komory by mal byť čo najmenší (zvyčajne do dvoch hodín), aby sa zabezpečilo splnenie kritérií prijateľnosti skúšky. Všetky oči použité v skúške by mali byť z tej istej skupiny očí odobratých v určitý deň.

▼M7

Keďže oči sa vyrezávajú v laboratóriu, neporušené hlavy sa dopravujú z bitúnka pri teplote okolitého prostredia (zvyčajne od 18oC do 25oC) v plastových boxoch a zvlhčujú sa utierkami namočenými do izotonického fyziologického roztoku.

Kritériá výberu očí a počet očí používaných v testovacej metóde izolovaného kuracieho oka

Oči, ktoré majú po odobratí vysoké počiatočné sfarbenie fluoresceínom (t. j. > 0,5) alebo vysokú hodnotu zákalu rohovky (t. j. > 0,5), sa vyradia.

Každá ovplyvnená skupina a súbežná pozitívna kontrola zahŕňa najmenej tri oči. Negatívna kontrolná skupina alebo kontrola rozpúšťadla (ak sa používa iné rozpúšťadlo, ako je fyziologický roztok) obsahuje minimálne jedno oko.

V prípade tuhých materiálov, ktorých použitie vedie k výsledku „bez kategórie podľa GHS OSN“, sa odporúča druhé testovanie s troma očami na potvrdenie alebo vyvrátenie negatívneho výsledku.

POSTUP

Príprava očí

Očné viečka sa opatrne odrežú, pričom sa dbá na to, aby sa nepoškodila rohovka. Celistvosť rohovky sa rýchlo posúdi kvapkou 2 % (hmotnostnej koncentrácie) fluoresceínu sodného, ktorá sa aplikuje na povrch rohovky na niekoľko sekúnd a potom sa opláchne fyziologickým roztokom. Oči s aplikovaným fluoresceínom sa potom prehliadnu pod mikroskopom so štrbinovou lampou, aby sa zabezpečilo, že rohovka je nepoškodená (t. j. hodnota zadržiavania fluoresceínu a zákalu rohovky $\leq$ 0,5).

Ak je rohovka nepoškodená, oko sa vyreže z lebky, pričom sa dáva pozor na to, aby sa nepoškodila rohovka. Očná guľa sa vytiahne z očnice, pričom sa tretie viečko pevne zachytí chirurgickými kliešťami a očné svaly sa prestrihnú ohnutými nožnicami s tupými hrotmi. Dôležité je zabrániť poškodeniu rohovky nadmerným tlakom (napr. kompresnými artefaktmi).

Keď sa oko vyberie z očnice, mala by sa na ňom ponechať viditeľná časť očného nervu. Po vybratí z očnice sa oko položí na absorpčnú podložku a odreže sa tretie viečko a iné spojovacie tkanivá.

Odobraté oko sa upevní do svorky z nehrdzavejúcej ocele tak, aby rohovka bola vo zvislej polohe. Svorka sa potom prenesie do komory superfúzneho prístroja (18). Svorky by sa mali do superfúzneho prístroja vložiť tak, aby sa fyziologický roztok dostával na celú rohovku (3 – 4 kvapky za minútu alebo 0,1 – 0,15 ml/min). Komory superfúzneho prístroja by mali mať riadenú teplotu 32 ± 1,5 °C. V dodatku 3 je uvedená schéma typického superfúzneho prístroja a očných svoriek, ktoré možno kúpiť alebo zhotoviť. Prístroj sa môže upraviť tak, aby vyhovoval potrebám konkrétneho laboratória (napr. na uloženie rôzneho počtu očí).

Oči sa po vložení do superfúzneho prístroja znova prehliadnu pod mikroskopom so štrbinovou lampou a skontroluje sa, či počas vyrezávania nedošlo k ich poškodeniu. Súčasne by sa mala odmerať aj hrúbka rohovky na vrchole rohovky s použitím zariadenia na meranie hĺbky na mikroskope so štrbinovou lampou. Oči s: i) hodnotou zadržiavania fluoresceínu > 0,5; ii) hodnotou zákalu rohovky > 0,5 alebo iii) s akýmikoľvek inými znakmi poškodenia by sa mali nahradiť. Spomedzi očí, ktoré sa nevyradia na základe niektorého z týchto kritérií, sa musia vyradiť oči s hrúbkou rohovky, ktorá má odchýlku viac ako 10 % od priemernej hodnoty pre všetky oči. Používatelia by mali vedieť, že mikroskopy so štrbinovou lampou môžu poskytovať rôzne namerané hodnoty hrúbky rohovky, ak je nastavená rôzna šírka štrbiny. Šírka štrbiny by mala byť nastavená na 0,095 mm.

▼M7

Keď sa všetky oči prezrú a sú vyhovujúce, inkubujú sa asi 45 až 60 minút, aby sa dosiahol ustálený stav s testovacím systémom pred dávkovaním. Po dobe ustálenia sa zaznamená nulové referenčné meranie pre hrúbku a zákal rohovky, ktoré slúži ako základný stav (t. j. čas = 0). Hodnota fluoresceínu stanovená pri vyrezávaní sa používa ako základné meranie tohto sledovaného parametra.

Aplikácia testovanej chemikálie

Hneď po nulových referenčných meraniach sa oko (v držiaku) vyberie zo superfúzneho prístroja, uloží sa do vodorovnej polohy a na rohovku sa aplikuje testovaná chemikália.

Kvapalné testované chemikálie sa zvyčajne testujú nezriedené, ale ak sa to považuje za potrebné, môžu sa zriediť (napr. ako súčasť návrhu štúdie). Ako rozpúšťadlo pre zriedené testované chemikálie sa uprednostňuje fyziologický roztok. V riadených podmienkach však možno používať aj alternatívne rozpúšťadlá, ale v prípade rozpúšťadiel iných ako fyziologický roztok by sa mala preukázať ich vhodnosť.

Kvapalné testované chemikálie sa aplikujú na rohovku tak, aby celý povrch rohovky bol rovnomerne pokrytý testovanou chemikáliou; štandardný objem je 0,03 ml.

Ak je to možné, tuhé testované chemikálie by sa mali čo najjemnejšie rozdrviť tĺčikom v mažiari alebo v podobnom drviacom nástroji. Prášok sa potom aplikuje na rohovku tak, aby povrch bol rovnomerne pokrytý testovanou chemikáliou; štandardné množstvo je 0,03 g.

Testovaná chemikália (kvapalná alebo tuhá) sa aplikuje na 10 sekúnd a potom sa opláchne z oka fyziologickým roztokom (približne 20 ml) pri teplote okolitého prostredia. Oko (v držiaku) sa následne vráti do superfúzneho prístroja do pôvodnej zvislej polohy. V prípade potreby sa môže opláchnutie zopakovať po 10-sekundovej aplikácii a pri následných časových bodoch (napr. pri zistení rezíduí testovanej chemikálie na rohovke). Všeobecne nie je množstvo fyziologického roztoku, ktoré sa použije dodatočne, rozhodujúce, ale dôležitá je skutočnosť, že došlo k spozorovaniu priľnutia chemikálie k rohovke.

Kontrolné chemikálie

Do každého experimentu by sa mali zaradiť súbežné negatívne kontroly alebo kontroly rozpúšťadla/nosiča a pozitívne kontroly.

Keď sa testujú kvapaliny so 100 % koncentráciou alebo tuhé látky, v testovacej metóde izolovaného kuracieho oka sa používa fyziologický roztok ako súbežná negatívna kontrola na zisťovanie nešpecifických zmien v testovacom systéme a na to, aby sa zabezpečilo, že podmienky skúšky nevedú neprimeraným spôsobom k reakcii vo forme podráždenia.

Keď sa testujú zriedené kvapaliny, v testovacej metóde sa používa súbežná kontrolná skupina rozpúšťadla/nosiča na zisťovanie nešpecifických zmien v testovacom systéme a na to, aby sa zabezpečilo, že podmienky skúšky nevedú neprimeraným spôsobom k reakcii vo forme podráždenia. Ako sa uvádza v bode 31, môže sa použiť iba také rozpúšťadlo/nosič, u ktorého sa preukázalo, že nemá žiadne nepriaznivé účinky na testovací systém.

Do každého pokusu sa začleňuje známa očná dráždivá látka ako súbežná pozitívna kontrola na overenie vyvolania primeranej reakcie. Keďže skúška izolovaného kuracieho oka sa používa v tejto testovacej metóde na identifikáciu žieravých alebo silne dráždivých látok, na pozitívnu kontrolu by sa mala použiť referenčná chemikália, ktorá v tejto testovacej metóde vyvoláva silnú reakciu. V snahe zabezpečiť možnosť posúdiť variabilitu reakcie na pozitívnu kontrolu

▼M7

v čase by však rozsah silnej reakcie nemal byť nadmerne veľký. Mali by sa vygenerovať dostatočné údaje *in vitro* na pozitívnu kontrolu, aby bolo možné vypočítať štatisticky definovaný prijateľný rozsah pre pozitívnu kontrolu. Ak na určitú pozitívnu kontrolu nie sú k dispozícii primerané historické údaje o testovacej metóde izolovaného kuracieho oka, môže byť potrebné vykonať štúdie, ktoré by tieto informácie poskytli.

Príkladom pozitívnych kontrol na kvapalné testované chemikálie je 10 % kyselina octová alebo 5 % benzalkónium chlorid, zatiaľ čo príkladom pozitívnych kontrol na tuhé testované chemikálie je hydroxid sodný alebo imidazol.

Referenčné chemikálie sú užitočné na posudzovanie potenciálu očnej dráždivosti neznámych chemikálií určitej chemickej triedy alebo triedy výrobkov alebo na posudzovanie potenciálu pomernej dráždivosti látky spôsobujúcej podráždenie očí s osobitným rozsahom dráždivých reakcií.

Merané sledované parametre

Ovplyvnené rohovky sa posudzujú pred ovplyvnením a 30, 75, 120, 180 a 240 minút (± 5 minút) po opláchnutí nasledujúcom po ovplyvnení. Tieto časové body poskytujú primeraný počet meraní počas štvorhodinového ovplyvňovania, pričom medzi meraniami zostáva dostatok času na vykonanie nevyhnutných pozorovaní všetkých očí.

Posudzované sledované parametre sú zákal rohovky, opuch rohovky, zadržiavanie fluoresceínu v rohovke a morfologické účinky (napr. jamkovanie alebo uvoľnenie epitelu). Všetky sledované parametre s výnimkou zadržiavania fluoresceínu (ktoré sa stanovuje iba pred ovplyvnením a 30 minút po vystavení účinkom testovanej chemikálie) sa stanovujú v každom z uvedených časových bodov.

Odporúča sa vyhotoviť fotografie na zdokumentovanie zákalu rohovky, zadržiavania fluoresceínu, morfologických účinkov a histopatológie, ak sa vykoná.

Po poslednom prehliadnutí po štyroch hodinách sa používateľom odporúča, aby oči uložili do vhodného fixačného roztoku (napr. neutrálneho tlmeného formalínu) pre prípadné histopatologické vyšetrenie [viac podrobných informácií možno nájsť v bode 14 a odkaze (8)].

Opuch rohovky sa stanovuje meraním hrúbky rohovky optickým pachymetrom na mikroskope so štrbinovou lampou. Vyjadruje sa v percentách a vypočíta sa z meraní hrúbky rohovky podľa tohto vzorca:

$$\left(\frac{\textit{hrúbka rohovky včase } t - \textit{hrúbka rohovky včase} = 0}{\textit{hrúbka rohovky včase} = 0} \right) \times 100$$

Priemerná percentuálna hodnota opuchu rohovky sa pri všetkých testovaných očiach vypočíta pre všetky časové body pozorovania. Na základe najvyššej priemernej hodnoty opuchu rohovky, nameranej v hociktorom časovom bode sa potom určí celková hodnota kategórie pre každú testovanú chemikáliu (pozri bod 51).

Zákal rohovky sa vyhodnocuje v tej časti rohovky, na ktorej je zákal najväčší, ako sa uvádza v tabuľke 1. Priemerná hodnota zákalu rohovky sa pri všetkých testovaných očiach vypočíta pre všetky časové body pozorovania. Na základe najvyššej priemernej hodnoty zákalu rohovky, nameranej v hociktorom časovom bode, sa potom určí celková hodnota kategórie pre každú testovanú chemikáliu (pozri bod 51).

▼M7

Tabuľka 1

Hodnoty zákalu rohovky

Hodnota	Pozorovanie
0	bez zákalu
0,5	veľmi slabý zákal
1	rozptýlené alebo roztrúsené plochy; detaily dúhovky sú jasne viditeľné
2	ľahko rozoznateľná priehľadná plocha; detaily dúhovky sú mierne zatemnené
3	silný zákal rohovky; žiadne špecifické detaily dúhovky nie sú viditeľné; veľkosť zrenice je sotva rozoznateľná
4	úplný zákal rohovky; dúhovka nie je viditeľná

Zadržiavanie fluoresceínu sa hodnotí len pri meraní v časovom bode 30 minút, ako sa uvádza v tabuľke 2. Priemerná hodnota zadržiavania fluoresceínu pri všetkých testovaných očiach sa potom vypočíta pre časový bod 30-minútového pozorovania a použije sa na určenie celkovej hodnoty kategórie pre každú testovanú chemikáliu (pozri bod 51).

Tabuľka 2

Hodnoty zadržiavania fluoresceínu

Hodnota	Pozorovanie
0	žiadne zadržiavanie fluoresceínu
0,5	veľmi malá škvrna na jednej bunke
1	škvrny na jednej bunke rozptýlené po celej ovplyvnenej ploche rohovky
2	ohniská alebo splývajúce husté škvrny na jednej bunke
3	splývajúce veľké plochy rohovky so zadržiavaním fluoresceínu

Medzi morfologické účinky patrí „jamkovanie“ buniek epitelu rohovky, „uvoľnenie epitelu“, „zdrsnenie“ povrchu rohovky a „nalepenie“ testovanej chemikálie na rohovku. Tieto zistenia môžu byť rôzne, pokiaľ ide o ich závažnosť, a môže k nim dôjsť súčasne. Klasifikácia týchto zistení je subjektívna podľa interpretácie výskumného pracovníka.

PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Vyhodnotenie údajov

Výsledné hodnoty zákalu rohovky, opuchu rohovky a zadržiavania fluoresceínu by sa mali posudzovať osobitne, aby sa stanovila trieda testovacích metód izolovaného kuracieho oka pre každý sledovaný parameter. Triedy testovacích metód izolovaného kuracieho oka sa pre každý sledovaný parameter následne spoja a stanoví sa klasifikácia dráždivosti pre každú testovanú chemikáliu.

Rozhodovacie kritériá

Keď sa posúdi každý sledovaný parameter, môžu sa priradiť triedy testovacích metód izolovaného kuracieho oka na základe vopred určeného rozsahu. Interpretácia opuchu rohovky (tabuľka 3), zákalu (tabuľka 4) a zadržiavania fluoresceínu (tabuľka 5) s použitím štyroch tried testovacích metód izolovaného kuracieho oka sa robí podľa nižšie uvedených hodnôt: Je dôležité upozorniť na to, že

▼M7

hodnoty opuchu rohovky uvedené v tabuľke 3 sa uplatňujú len vtedy, ak sa hrúbka meria mikroskopom so štrbinovou lampou (napríklad Haag-Streit BP900) so zariadením na meranie hĺbky č. 1 a pri nastavení šírky štrbiny $9\frac{1}{2}$, ktorá sa rovná 0,095 mm. Používatelia by mali vedieť, že mikroskopy so štrbinovou lampou by mohli poskytovať rôzne namerané hodnoty hrúbky rohovky, ak je nastavená rôzna šírka štrbiny.

Tabuľka 3

Klasifikačné kritériá testovacích metód izolovaného kuracieho oka vzťahujúce sa na opuch rohovky

Priemerná hodnota opuchu rohovky (v %) (*)	Trieda testovacích metód izolovaného kuracieho oka
0 až 5	I
> 5 až 12	II
> 12 až 18 (> 75 min. po ovplyvnení)	II
> 12 až 18 (≤ 75 min. po ovplyvnení)	III
> 18 až 26	III
> 26 až 32 (> 75 min. po ovplyvnení)	III
> 26 až 32 (≤ 75 min. po ovplyvnení)	IV
> 32	IV

(*) Najvyššia priemerná hodnota nameraná v ktoromkoľvek časovom bode

Tabuľka 4

Klasifikačné kritériá testovacích metód izolovaného kuracieho oka vzťahujúce sa na zákal

Maximálna priemerná hodnota zákalu (*)	Trieda testovacích metód izolovaného kuracieho oka
0,0 až 0,5	I
0,6 až 1,5	II
1,6 až 2,5	III
2,6 až 4,0	IV

(*) Maximálna priemerná hodnota pozorovaná v ktoromkoľvek časovom bode (založená na hodnotách zákalu uvedených v tabuľke 1).

Tabuľka 5

Klasifikačné kritériá testovacích metód izolovaného kuracieho oka vzťahujúce sa na priemernú hodnotu zadržiavania fluoresceínu

Priemerná hodnota zadržiavania fluoresceínu 30 minút po ovplyvnení (*)	Trieda testovacích metód izolovaného kuracieho oka
0,0 až 0,5	I
0,6 až 1,5	II
1,6 až 2,5	III
2,6 až 3,0	IV

(*) Na základe hodnôt uvedených v tabuľke 2.

Klasifikácia testovanej chemikálie *in vitro* sa hodnotí pomocou klasifikácie GHS, ktorá zodpovedá kombinácii kategórií získaných pre opuch rohovky, zákal rohovky a zadržiavanie fluoresceínu, ako sa uvádza v tabuľke 6.

▼M7

Tabuľka 6

Celkové *in vitro* klasifikácie

Klasifikácia GHS OSN	Kombinácie 3 sledovaných parametrov
Bez kategórie	3 × I 2 × I, 1 × II
predpoklad nie je možný	Iné kombinácie
Kategória 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Zákal rohovky ≥ 3 po 30 minútach (aspoň v 2 očiach) Zákal rohovky = 4 v ktoromkoľvek časovom bode (aspoň v 2 očiach) Silné uvoľnenie epitelu (aspoň v 1 oku)

(*) Výskyt uvedených kombinácií je menej pravdepodobný.

Kritéria prijateľnosti štúdie

Test sa pokladá za prijateľný, ak sa súbežne negatívne kontroly alebo kontroly nosiča/rozpúšťadla a súbežne pozitívne kontroly označujú ako chemikálie bez klasifikácie v zmysle GHS OSN a chemikálie kategórie 1 GHS OSN v uvedenom poradí.

Skúšobný protokol

Skúšobný protokol by mal obsahovať tieto informácie, ak sú relevantné pre vykonanie štúdie:

Testované chemikálie a kontrolné chemikálie

— Názov(-vy) chemikálií, ako je systémový názov, ktorý používa služba Chemical Abstracts Service (CAS), po ktorom nasledujú iné názvy, ak sú známe,

— registračné číslo CAS, ak je známe,

— čistota a zloženie testovaných chemikálií/kontrolných chemikálií (v hmotnostných percentách), pokiaľ je táto informácia k dispozícii,

— fyzikálno-chemické vlastnosti, ako je fyzikálny stav, prchavosť, pH, stabilita, chemická trieda, rozpustnosť vo vode, ktorá má význam pre vykonanie štúdie,

— prípadná úprava testovaných chemikálií/kontrolných chemikálií pred testovaním (napr. zahrievanie, drvenie),

— stabilita, ak je známa.

Informácie týkajúce sa objednávateľa a testovacieho zariadenia

— meno a adresa objednávateľa, testovacieho zariadenia a vedúceho štúdie,

— identifikácia zdroja očí (napr. zariadenie, v ktorom sa vykonal ich odber).

Podmienky testovacej metódy

— opis použitého testovacieho systému,

▼M7

— použitý mikroskop so štrbinovou lampou (napr. model) a nastavenia použitého mikroskopu so štrbinovou lampou,

— odkaz na historické výsledky negatívnych a pozitívnych kontrol a v prípade potreby historické údaje preukazujúce prijateľné rozsahy súbežných referenčných kontrol,

— postup použitý na zabezpečenie integrity (t. j. presnosti a spoľahlivosti) testovacej metódy v čase (napr. periodické testovanie chemikálií na preukázanie spôsobilosti).

Odber a príprava očí

— vek a hmotnosť darcovského zvieraťa a iné osobitné charakteristické vlastnosti zvieraťa, ktorému sa odobrali oči, ak sú k dispozícii (napr. pohlavie, kmeň),

— podmienky skladovania a dopravy očí (napr. dátum a čas odberu očí, časový interval medzi odberom kuracích hláv a uložením odobratých očí do superfúznej komory),

— príprava a upevnenie očí vrátane vyhlásení o ich kvalite, teplota komôr na oči a kritériá výberu očí použitých na testovanie.

Postup testu

— počet použitých replikátov,

— identita použitých negatívnych a pozitívnych kontrol (prípadne aj kontroly rozpúšťadla a referenčné kontroly),

— dávka testovanej chemikálie, jej aplikácia a doba expozície,

— časové body pozorovania (pred ovplyvnením a po ňom),

— opis použitých hodnotiacich a rozhodovacích kritérií,

— opis použitých kritérií prijateľnosti štúdie,

— opis všetkých zmien postupu testu.

Výsledky

— hodnoty opuchu rohovky, zákalu rohovky a zadržiavania fluoresceínu získané pre každé oko samostatne v každom časovom bode pozorovania vrátane priemerných hodnôt v každom časovom bode pri všetkých testovaných očiach spracované v podobe tabuľky,

— najvyššie namerané priemerné hodnoty opuchu rohovky, zákalu rohovky a zadržiavania fluoresceínu (z akéhokoľvek časového bodu) a ich príslušná trieda testovacích metód izolovaného kuracieho oka,

— opis všetkých ďalších pozorovaných účinkov,

— odvodená klasifikácia GHS OSN *in vitro*,

— prípadne fotografie oka.

Diskusia o výsledkoch

Záver

▼**M7**

LITERATÚRA

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. Dostupné na: 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. Dostupné na: 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. Dostupné na: 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. Dostupné na: 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. Chapter B.5 of this Annex, Acute eye irritation/corrosion.

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. Dostupné na: 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. Dostupné na: 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. Dostupné na: 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

Dodatok 1

DEFINÍCIE

Presnosť: blízkosť zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o meranie analytického výkonu testovacej metódy a jeden aspekt „relevantnosti“. Tento pojem sa často zamieňa s pojmom „zhoda“ na označenie podielu správnych výsledkov testovacej metódy.

Referenčná chemikália: chemikália, ktorá sa používa ako štandardná na porovnávanie s testovanou chemikáliou. Referenčná chemikália by mala mať tieto vlastnosti: i) konzistentný(-é) a spoľahlivý(-é) zdroj(-e); ii) štruktúrna a funkčná podobnosť s triedou chemikálií, ktoré sa testujú; iii) známe fyzikálno-chemické vlastnosti; iv) podporné údaje o známych účinkoch a v) známy potenciál v rozsahu želanej reakcie.

Prístup zdola nahor: prístup v postupných krokoch použitý v prípade chemikálie, o ktorej sa predpokladá, že nevyžaduje klasifikáciu ako chemikália spôsobujúca podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí. Začína odlíšením chemikálií nevyžadujúcich klasifikáciu (negatívny výsledok) od ostatných chemikálií (pozitívny výsledok).

Chemikália: látka alebo zmes.

Rohovka: priehľadná časť prednej strany očnej gule, ktorá pokrýva dúhovku a zrenicu a prepúšťa svetlo do vnútra oka.

Zákal rohovky: meranie rozsahu zakalenia rohovky po vystavení účinkom testovanej chemikálie. Zvýšený zákal rohovky je príznakom poškodenia rohovky.

Opuch rohovky: objektívne meranie rozsahu zakalenia rohovky v teste izolovaného kuracieho oka po vystavení účinkom testovanej chemikálie. Je vyjadrený v percentách a vypočíta sa z meraní základnej hrúbky rohovky (na dávku) a hrúbky zaznamenávanej v pravidelných intervaloch po vystavení účinkom testovanej chemikálie v teste izolovaného kuracieho oka. Stupeň opuchu rohovky je príznakom poškodenia rohovky.

Podráždenie očí: vyvolanie zmien na oku po aplikácii testovanej chemikálie na vonkajší povrch oka, ktoré sú do 21 dní po aplikácii úplne reverzibilné. Zamieňa sa s pojmami „reverzibilné účinky na oči“ a „kategória 2 GHS OSN“ (4).

Miera falošnej negativity: podiel všetkých pozitívnych chemikálií, ktoré sú na základe testovacej metódy nesprávne identifikované ako negatívne. Je to jeden ukazovateľ analytického výkonu testovacej metódy.

Miera falošnej pozitivity: podiel všetkých negatívnych chemikálií, ktoré sú na základe testovacej metódy nesprávne identifikované ako pozitívne. Je to jeden ukazovateľ analytického výkonu testovacej metódy.

Zadržiavanie fluoresceínu: v teste izolovaného kuracieho oka subjektívne meranie rozsahu fluoresceínu sodného zadržiavaného epitelovými bunkami v rohovke po vystavení účinkom testovanej chemikálie. Stupeň zadržiavania fluoresceínu je príznakom poškodenia epitelu rohovky.

Nebezpečnosť: inherentná vlastnosť činidla alebo situácia, ktorá má potenciál spôsobiť nepriaznivé účinky, ak sú organizmus, systém alebo populácia (subpopulácia) vystavené účinkom tohto činidla.

Ireverzibilné účinky na oči: pozri „vážne poškodenie očí“ a „kategória 1 GHS OSN“.

▼M7

Zmes: zmes alebo roztok pozostávajúce z dvoch alebo viacerých látok, ktoré v nej/ňom nereagujú (4).

Negatívna kontrola: neovplyvnený replikát, ktorý obsahuje všetky zložky testovacieho systému. Táto vzorka sa spracuje so vzorkami ovplyvnenými testovanou chemikáliou a s ostatnými kontrolnými vzorkami s cieľom stanoviť, či rozpúšťadlo a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Neklasifikované: látky, ktoré nie sú klasifikované ako látky spôsobujúce podráždenie očí (kategória 2 GHS OSN) ani ako látky spôsobujúce vážne poškodenie očí (kategória 1 GHS OSN). Zamieňa sa s pojmom „bez kategórie v zmysle GHS OSN“.

Pozitívna kontrola: replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému a ovplyvnený chemikáliou, o ktorej je známe, že vyvoláva pozitívnu reakciu. S cieľom zabezpečiť možnosť posudzovať variabilitu reakcie pozitívnej kontroly po celý čas by rozsah silnej reakcie nemal byť nadmerne veľký.

Spoľahlivosť: merania rozsahu, v rámci ktorého môže byť testovacia metóda v priebehu určitého času reprodukovateľná v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, keď sa používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti a medzilaboratórnej opakovateľnosti.

Reverzibilné účinky na oči: pozri „podráždenie očí“ a „kategória 2 GHS OSN“.

Vážne poškodenie očí: vyvolanie poškodenia tkaniva v oku alebo vážneho fyzického zhoršenia zraku po aplikácii testovanej chemikálie na vonkajší povrch oka, ktoré nie je úplne reverzibilné do 21 dní po aplikácii. Zamieňa sa s pojmami „ireverzibilné účinky na oči“ a „kategória 1 GHS OSN“ (4).

Mikroskop so štrbinovou lampou: nástroj používaný na priame skúmanie oka pri zväčšení pod binokulárnym mikroskopom s vytvorením stereoskopického vzpriameného obrazu. V testovacej metóde izolovaného kuracieho oka sa tento prístroj používa na prehliadanie predných štruktúr kuracieho oka, ako aj na objektívne meranie hrúbky rohovky pomocou pripojeného zariadenia na meranie hĺbky.

Kontrola rozpúšťadla/nosiča: neovplyvnená vzorka, ktorá obsahuje všetky zložky testovacieho systému vrátane rozpúšťadla alebo nosiča a ktorá sa spracúva so vzorkami ovplyvnenými testovanou chemikáliou a s inými kontrolnými vzorkami, aby sa zistila základná reakcia vzoriek ovplyvnených testovanou chemikáliou rozpustenou v tom istom rozpúšťadle alebo nosiči. Keď sa táto vzorka testuje so súbežnou negatívnou kontrolou, preukazuje aj to, či rozpúšťadlo alebo nosič s testovacím systémom na seba navzájom pôsobia.

Látka: chemické prvky a ich zlúčeniny v prirodzenom stave alebo získané akýmkoľvek procesom výroby vrátane akejkoľvek prísady potrebnej na udržanie stability produktu a akýchkoľvek nečistôt vzniknutých v použitom procese, ale s výnimkou každého rozpúšťadla, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo zmeny jej zloženia (4).

Povrchovo aktívna látka: takisto nazývaná surfaktant, je látka, ako napríklad detergent, ktorá dokáže znížiť povrchové napätie kvapaliny, a tak jej umožniť penenie alebo prenikanie do tuhých látok. Nazýva sa aj zvlhčujúce činidlo.

▼M7

Prístup zhora nadol: prístup v postupných krokoch použitý v prípade chemikálie, o ktorej sa predpokladá, že spôsobuje vážne poškodenie očí. Začína odlíšením chemikálií spôsobujúcich vážne poškodenie očí (pozitívny výsledok) od ostatných chemikálií (negatívny výsledok).

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Stratégia viacúrovňového testovania: stratégia postupného testovania, pri ktorej sa v presne určenom poradí na každej úrovni preskúmavajú všetky existujúce informácie o testovanej chemikálii pomocou analýzy váhy dôkazov s cieľom zistiť, či sú dostupné dostatočné informácie na to, aby sa mohlo prijať rozhodnutie o klasifikácii nebezpečnosti pred tým, ako sa postúpi na ďalšiu úroveň. Ak možno testovanej chemikálii na základe existujúcich informácií pripísať potenciál spôsobiť podráždenie, nevyžaduje sa ďalšie testovanie. Ak na základe existujúcich informácií nemožno testovanej chemikálii pripísať potenciál spôsobiť podráždenie očí, použije sa prístup postupného testovania na zvieratách v jednotlivých krokoch, až kým nebude možná jednoznačná klasifikácia.

Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií (GHS) Organizácie spojených národov (OSN): systém navrhujúci klasifikáciu chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálnych, zdravotných a enivornmentálnych nebezpečností a ich označovanie zodpovedajúcimi komunikačnými prvkami, ako sú piktogramy, výstražné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o nepriaznivých účinkoch daných chemikálií v záujme ochrany osôb (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a subjektov reakcie na núdzové situácie) a životného prostredia (4).

Kategória 1 GHS OSN: pozri „vážne poškodenie očí“ a/alebo „ireverzibilné účinky na oči“.

Kategória 2 GHS OSN: pozri „podráždenie očí“ a/alebo „reverzibilné účinky na oči“.

Bez kategórie v zmysle GHS OSN: látky, ktoré nespĺňajú požiadavky na klasifikáciu ako chemikálie kategórie 1 alebo 2 (2A alebo 2B) GHS OSN. Zamieňa sa s pojmom „bez kategórie“.

Validovaná testovacia metóda: testovacia metóda, v prípade ktorej sa vykonali validačné štúdie s cieľom určiť relevantnosť (vrátane presnosti) a spoľahlivosť na konkrétny účel. Je dôležité poznamenať, že validovaná testovacia metóda nemusí mať dostatočný analytický výkon z hľadiska presnosti a spoľahlivosti, aby bola prijateľná pre navrhovaný účel.

Analýza váhy dôkazov: postup posudzovania silných a slabých stránok rôznych informácií na dosiahnutie a podporu záveru, pokiaľ ide o potenciál nebezpečnosti chemikálie.

▼M7

Dodatok 2

CHEMIKÁLIE NA PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI VYKONÁVAŤ TESTOVACIU METÓDU IZOLOVANÉHO KURACIEHO OKA

Pred rutinným použitím testovacej metódy, ktorá sa pridržiava tejto testovacej metódy, by laboratóriá mali preukázať technickú spôsobilosť tak, že správne určia klasifikáciu nebezpečnosti pre oči v prípade 13 chemikálií odporúčaných v tabuľke 1. Tieto chemikálie boli vybraté tak, aby predstavovali rozsah reakcií na nebezpečnosti pre oči na základe výsledkov očného testu *in vivo* na králikoch (TG 405) a klasifikačného systému GHS OSN (t. j. kategórie 1, 2A, 2B alebo bez kategórie) (4)(6). Ďalším kritériom výberu bola komerčná dostupnosť chemikálií, dostupnosť vysoko kvalitných referenčných údajov *in vivo* a dostupnosť vysoko kvalitných údajov z testovacej metódy izolovaného kuracieho oka *in vitro*. Referenčné údaje sú dostupné v skrátenom súhrnnom dokumente (SSD) (5) a v podkladovom kontrolnom dokumente (Background Review Document) ICCVAM pre testovaciu metódu izolovaného kuracieho oka (9).

Tabuľka 1

Odporúčané chemikálie na preukazovanie technickej spôsobilosti pomocou testovacej metódy izolovaného kuracieho oka

Chemikália	CAS číslo	Chemická trieda (1)	Fyzikálna forma	Klasifikácia *In Vivo* (2)	Klasifikácia *In Vitro* (3)
Benzalkónium chlorid (5 %)	8001-54-5	óniová zlúčenina	kvapalina	kategória 1	kategória 1
Chlórhexidín	55-56-1	amín, amidín	tuhá látka	kategória 1	kategória 1
Kyselina dibenzoyl-L-vínna	2743-38-6	karboxylová kyselina, ester	tuhá látka	kategória 1	kategória 1
Imidazol	288-32-4	heterocyklická zlúčenina	tuhá látka	kategória 1	kategória 1
Kyselina trichlóroctová (30 %)	76-03-9	karboxylová kyselina	kvapalina	kategória 1	kategória 1
2,6-dichlórbenzoyl chlorid	4659-45-4	acylhalogenid	kvapalina	kategória 2A	predpoklad nie je možný (4)
Dusičnan amónny	6484-52-2	anorganická soľ	tuhá látka	kategória 2A (5)	predpoklad nie je možný (4)
Etyl-2-metylaceto-octan	609-14-3	ketón, ester	kvapalina	kategória 2 B	predpoklad nie je možný (4)
Dimetylsulfoxid	67-68-5	organická zlúčenina síry	kvapalina	bez kategórie	bez kategórie
Glycerol	56-81-5	Alcohol	kvapalina	bez kategórie	bez kategórie (hraničná hodnota)
Metylcyklopentán	96-37-7	uhľovodík (cyklický)	kvapalina	bez kategórie	bez kategórie
n-hexán	110-54-3	uhľovodík (acyklický)	kvapalina	bez kategórie	bez kategórie

▼**M7**

Chemikália	CAS číslo	Chemická trieda ([1])	Fyzikálna forma	Klasifikácia *In Vivo* ([2])	Klasifikácia *In Vitro* ([3])
Triacetín	102-76-1	Lipid	kvapalina	bez klasifikácie	bez kategórie

Skratky: CASRN = registračné číslo CAS (Chemical Abstracts Service)/CAS číslo

([1]) Chemické triedy boli stanovené pre každú testovanú chemikáliu s použitím štandardnej klasifikačnej schémy na základe klasifikačného systému National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (dostupné na http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Na základe výsledkov *in vivo* očného testu na králikoch (OECD TG 405) a s použitím GHS OSN (4)(6).

([3]) Na základe výsledkov testovacej metódy izolovaného kuracieho oka, ako sa uvádza v tabuľke 6.

([4]) Kombinácia výsledkov testovacej metódy izolovaného kuracieho oka, iných ako sú výsledky uvedené v tabuľke 6 týkajúce sa identifikácie chemikálií bez kategórie v zmysle GHS OSN a chemikálií kategórie 1 GHS OSN (pozri tabuľku 6).

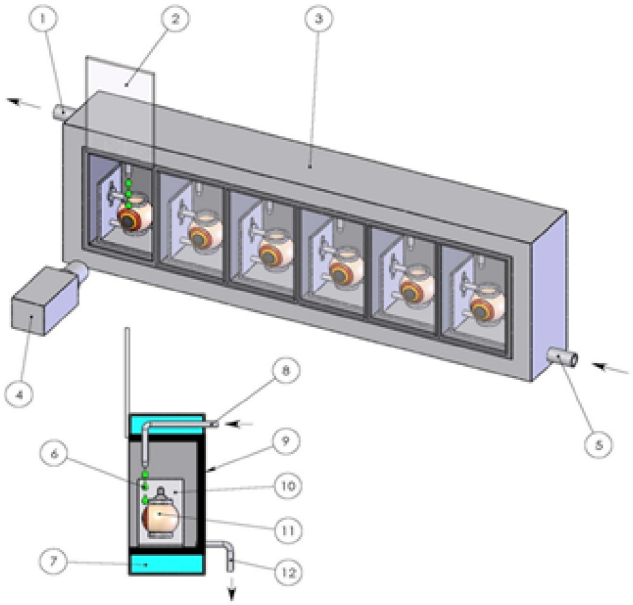
([5]) Klasifikácia v kategóriách 2A alebo 2B závisí od interpretácie kritéria GHS OSN pre rozlišovanie medzi týmito dvoma kategóriami, t. j. 1 z 3 v. 2 z 3 zvierat s účinkami v deň 7, potrebného na klasifikáciu v kategórii 2A. Do štúdie *in vivo* boli zahrnuté 3 zvieratá. Všetky sledované parametre s výnimkou začervenania spojoviek v prípade jedného zvieraťa sa do dňa 7 alebo skôr vrátili na nulovú hodnotu. Toto jedno zviera, ktoré sa do dňa 7 v plnej miere nezotavilo, vykazovalo (v deň 7) začervenanie spojoviek s hodnotou 1, ktoré sa v deň 10 vrátilo na pôvodnú hodnotu.

▼M7

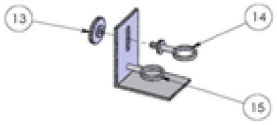
Dodatok 3

SCHEMATICKÝ NÁKRES SUPERFÚZNEHO PRÍSTROJA A OČNÝCH SVORIEK

[Ďalšie generické opisy superfúzneho prístroja a očných svoriek uvádza Burton et al.(18)]



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Číslo položky	Opis	Číslo položky	Opis
1	odtok teplej vody	9	komora
2	posuvný kryt	10	držiak očí
3	superfúzny prístroj	11	kuracie oko
4	optický merací prístroj	12	odtok fyziologického roztoku
5	prívod teplej vody	13	nastavovacia skrutka
6	fyziologický roztok	14	nastaviteľné horné rameno
7	teplá voda	15	pevné dolné rameno
8	prívod fyziologického roztoku		

▼M7

B.49. MIKROJADROVÝ (MIKRONUKLEOVÝ) TEST NA CICAVČÍCH BUNKÁCH *IN VITRO*

ÚVOD

Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov 487 (2016). Je súčasťou série testovacích metód genetickej toxikológie. Bol vypracovaný dokument OECD, ktorý obsahuje stručné informácie o testovaní v oblasti genetickej toxikológie a prehľad posledných zmien, ktoré sa vykonali v týchto usmerneniach na vykonávanie testov (1).

Mikrojadrový test *in vitro* (MNvit) je test na genotoxicitu, ktorého cieľom je zistiť prítomnosť mikrojadier (MN) v cytoplazme buniek v interfáze. Mikrojadrá môžu pochádzať z acentrických fragmentov chromozómov (t. j. fragmentov, ktorým chýba centroméra) alebo z celých chromozómov, ktoré v štádiu anafázy pri delení bunky nie sú schopné migrovať k pólom. Preto je test MNvit metódou *in vitro*, ktorá poskytuje komplexný základ pre skúmanie potenciálu poškodzovania chromozómov *in vitro*, keďže je možné zistiť aneugény, ako aj klastogény (2) (3) v bunkách, ktoré prešli delením buniek počas vystavenia účinkom testovanej chemikálie alebo po ňom (viac podrobných informácií možno nájsť v bode 13). Mikrojadrá predstavujú poškodenie, ktoré sa prenáša na dcérske bunky, zatiaľ čo chromozómové aberácie zaznamenané v bunkách v metafáze nemožno prenášať. V oboch z týchto prípadoch je možné, že tieto zmeny nebudú zlúčiteľné s prežitím bunky.

Táto testovacia metóda umožňuje použitie protokolov s inhibítorom polymerizácie aktínu, cytochalasínom B (cytoB), ako aj bez neho. Pridanie cytoB pred mitózou vedie k vzniku buniek, ktoré sú dvojjadrové, a preto umožňuje identifikáciu a analýzu mikrojadier len v tých bunkách, v ktorých prebehla jedna mitóza (4) (5). Táto testovacia metóda rovnako umožňuje použitie protokolov bez blokovania cytokinézy, pokiaľ existuje dôkaz, že analyzovaná populácia buniek prešla mitózou.

Okrem použitia testu MNvit na identifikáciu chemikálií, ktoré vyvolávajú vznik mikrojadier, možno s použitím imunochemického označovania kinetochórov alebo hybridizáciou s použitím centromerických/telomerických sond [(fluorescenčná hybridizácia *in situ* – (FISH)] takisto získať ďalšie informácie o mechanizmoch poškodzovania chromozómov a tvorbe mikrojadier (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Uvedené postupy označovania a hybridizácie možno použiť vtedy, keď sa zvýši tvorba mikrojadier a výskumný pracovník chce určiť, či je tento nárast výsledkom klastogénnych a/alebo aneugénnych procesov.

Keďže mikrojadrá v bunkách v interfáze možno hodnotiť relatívne objektívne, pracovníci laboratória musia zistiť len počet dvojjadrových buniek v prípade použitia cytoB a výskyt buniek s mikrojadrami vo všetkých prípadoch. Vďaka tomu možno preparáty pomerne rýchlo vyhodnotiť a analýzu možno vykonať automaticky. Takto sa počas jedného ovplyvňovania môžu vyhodnotiť prakticky tisíce, a nielen stovky buniek, čím sa zvyšuje sila testu. Nakoniec, keďže mikrojadrá môžu vzniknúť v dôsledku chýbajúcich chromozómov, existuje možnosť zistiť činitele indukujúce aneuploidiu, ktoré je ťažké skúmať pomocou bežných testov na chromozómové aberácie, napr. kapitola B.10 tejto prílohy (18). Test MNvit opísaný v tejto testovacej metóde však neumožňuje rozlišovať chemikálie indukujúce zmeny v počte chromozómov a/alebo polyploidiu od tých chemikálií, ktoré indukujú klastogenicitu bez použitia špeciálnych techník, ako je metóda FISH uvedená v bode 4.

Test MNvit je spoľahlivý a možno ho vykonať v prípade rôznych druhov buniek a za prítomnosti alebo neprítomnosti cytoB. Existuje množstvo údajov na podporu validity testu MNvit s použitím rôznych druhov buniek (kultúr bunkových línií alebo primárnych bunkových kultúr) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Patria sem najmä medzinárodné validačné štúdie, ktoré koordinuje spoločnosť Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23), a správy z medzinárodného

▼M7

seminára o testovaní genotoxicity (International Workshop on Genotoxicity Testing) (5) (17). Dostupné údaje boli opätovne prehodnotené pomocou retrospektívnej validačnej štúdie založenej na analýze váhy dôkazov, ktorú uskutočnilo Európske centrum pre validáciu alternatívnych metód (ECVAM) Európskej komisie, a táto testovacia metóda bola Vedeckým poradným výborom (ESAC) ECVAM schválená ako vedecky platná (37) (38) (39).

V teste MNvit na cicavčích bunkách možno použiť kultúry bunkových línií alebo primárne bunkové kultúry ľudského alebo hlodavčieho pôvodu. Keďže frekvencia mikrojadier v pozadí ovplyvní citlivosť testu, odporúča sa použiť druhy buniek, ktoré majú stabilnú a definovanú frekvenciu tvorby mikrojadier v pozadí. Použité bunky sa vyberajú na základe ich schopnosti dobrého rastu v kultúre, stability karyotypu (vrátane počtu chromozómov) a spontánnej frekvencie výskytu mikrojadier (40). Údaje, ktoré sú v súčasnosti k dispozícii, neumožňujú vyvodiť jednoznačné odporúčania. Naznačujú však, že pri hodnotení chemickej nebezpečnosti je dôležité zvážiť stav *p53*, genetickú stabilitu (stabilitu karyotypu), reparačnú schopnosť DNA a pôvod buniek (bunky pochádzajúce z hlodavcov versus bunky ľudského pôvodu), ktoré boli vybraté na testovanie. Používateľom tejto testovacej metódy sa preto odporúča, aby pri zisťovaní indukcie mikrojadier zvážili vplyv týchto a iných charakteristických vlastností buniek na správanie bunkovej línie, a to vzhľadom na rozvíjajúce sa poznatky v tejto oblasti.

Použité definície sa uvádzajú v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

Testy, ktoré sa vykonávajú *in vitro*, si zvyčajne vyžadujú použitie exogénneho zdroja metabolickej aktivácie okrem prípadov, keď majú bunky metabolickú kapacitu (schopnosť) s ohľadom na testované chemikálie. Exogénny systém metabolickej aktivácie nenapodobňuje v plnej miere podmienky *in vivo*. Je potrebné zabrániť vzniku podmienok, ktoré by mohli viesť k umelo pozitívnym výsledkom, ktoré neodrážajú genotoxicitu testovaných chemikálií. Takéto podmienky zahŕňajú zmeny pH (41) (42) (43) alebo osmolality, interakciu s médiom na kultiváciu buniek (44) (45) alebo príliš vysoké úrovne cytotoxicity (pozri bod 29).

Pri analýze indukcie mikrojadier je dôležité, aby mitóza prebehla v ovplyvňovaných aj v neovplyvňovaných kultúrach. Najinformatívnejšie štádium na hodnotenie mikrojadier je v bunkách, ktoré prešli jednou mitózou počas ovplyvňovania testovanou chemikáliou alebo po ňom. Pri vyrábaných nanomateriáloch je nutné v tejto testovacej metóde vykonať určité úpravy, ktoré však v tejto testovacej metóde nie sú opísané.

Pred použitím tejto testovacej metódy na zmesi s cieľom získať údaje na zamýšľaný regulačný účel by sa malo zvážiť, či na tento účel dokáže poskytnúť primerané výsledky, a ak dokáže, z akých dôvodov. Také úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi.

PRINCÍP TESTU

Bunkové kultúry ľudského pôvodu alebo pochádzajúce z iných cicavcov sú vystavené testovanej chemikálii s exogénnym zdrojom metabolickej aktivácie aj bez neho, pokiaľ nie sú použité bunky s dostatočnou schopnosťou metabolizácie (pozri bod 19).

Počas vystavenia účinkom testovanej chemikálie alebo po nej sa bunky dostatočne dlho kultivujú, čím sa má umožniť, aby poškodenie chromozómov alebo iné účinky na bunkový cyklus/delenie buniek viedli k vytvoreniu mikrojadier v bunkách v interfáze. Na indukciu aneuploidie je zvyčajne potrebné, aby bola testovaná chemikália prítomná počas mitózy. Odobraté a zafarbené bunky v interfáze sa analyzujú na prítomnosť mikrojadier. V ideálnom prípade by sa mali mikrojadrá hodnotiť len v tých bunkách, v prípade ktorých počas vystavenia

▼M7

účinkom testovanej chemikálie alebo v čase po ovplyvnení (ak sa použije) prebehla mitóza. Ak boli kultúry ovplyvnené blokátorom cytokinézy, tento výsledok sa dosiahne hodnotením len dvojjadrových buniek. Ak sa blokátor cytokinézy nepoužije, je dôležité na základe zvýšenia bunkovej populácie preukázať, že analyzované bunky pravdepodobne prešli delením počas vystavenia účinkom testovanej chemikálie alebo po ňom. V prípade všetkých protokolov je dôležité preukázať, že došlo k proliferácii buniek v kontrolných, ako aj ovplyvnených kultúrach, a vo všetkých kultúrach, v prípade ktorých sa hodnotí výskyt mikrojadier, by sa mala posúdiť miera cytotoxicity alebo cytostázy vyvolané testovanou chemikáliou.

OPIS METÓDY

Bunky

Môžu sa použiť kultivované primárne ľudské alebo iné cicavčie periférne lymfocyty (7) (20) (46) (47) a niekoľko bunkových línií hlodavcov ako CHO, V79, CHL/IU a bunky L5178Y alebo ľudské bunkové línie ako TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (pozri bod 6). V mikrojadrovom testovaní sa používajú aj iné bunkové línie, ako sú HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), bunky HepG2 (52) (53), A549 a primárne embryonálne bunky škrečka sýrskeho (54), ale v súčasnosti ešte nie sú v rozsiahlej miere validované. Preto musí byť použitie uvedených bunkových línií a typov odôvodnené na základe ich preukázaného správania sa v teste, ako sa uvádza v oddiele kritériá prijateľnosti. O cytoB bolo zaznamenané, že dokáže ovplyvniť rast buniek L5178Y, a preto sa neodporúča používať s touto bunkovou líniou (23). Pri použití primárnych buniek by sa malo z dôvodov rešpektovania dobrých podmienok zvierat, pokiaľ je to možné, zvážiť použitie buniek ľudského pôvodu a odber vzoriek by sa mal vykonať v súlade s humánnymi etickými zásadami a predpismi.

Ľudské periférne lymfocyty by mali pochádzať od mladých nefajčiarov (vo veku približne od 18 do 35 rokov), o ktorých nie je známe, že by trpeli nejakou chorobou alebo že by boli v poslednom čase vystavení genotoxickým činidlám (napr. chemikáliám, ionizujúcemu žiareniu) na úrovniach, ktoré by zvýšili výskyt skrytých buniek s mikrojadrami. Tým by sa zabezpečilo, že výskyt buniek s mikrojadrami v pozadí bude nízky a stály. Základný výskyt buniek s mikrojadrami sa vekom zvyšuje a tento trend je výraznejší u žien ako u mužov (55). Ak sa používajú spoločne bunky od viac ako jedného darcu, mal by sa uviesť počet darcov. Je nevyhnutné preukázať, že bunky sa delili od začiatku ovplyvňovania testovanou chemikáliou až do vtedy, kým sa z nich odobrali vzorky. Bunkové kultúry sa udržiavajú vo fáze exponenciálneho rastu (bunkové línie) alebo sa stimulujú k deleniu (primárne kultúry lymfocytov), aby bolo možné vystavenie buniek v rôznych štádiách bunkového cyklu, pretože citlivosť buniek v jednotlivých štádiách na testované chemikálie nemusí byť známa. Primárne bunky, ktoré k deleniu potrebujú stimuláciu mitogénnymi aktivátormi, počas vystavenia účinkom testovanej chemikálie už zvyčajne nie sú synchronizované (napr. ľudské lymfocyty po 48-hodinovej mitogénnej stimulácii). Použitie synchronizovaných buniek počas ovplyvňovania testovanou chemikáliou sa neodporúča, no môže sa akceptovať, ak je odôvodnené.

Médiá a podmienky kultivácie

Na udržiavanie kultúr by sa mali používať vhodné rastové médiá a inkubačné podmienky (kultivačné nádoby, prípadne atmosféra s vyššou relatívnou vlhkosťou a 5 % CO_2, teplota 37 °C). Bunkové línie by sa mali pravidelne kontrolovať na stabilitu modálneho počtu chromozómov a absenciu kontaminácie *Mycoplasma*. V prípade kontaminácie alebo zmeny modálneho počtu chromozómov by sa nemali používať. Mala by sa stanoviť dĺžka bežného bunkového cyklu bunkových línií alebo primárnych kultúr použitých v skúšobnom laboratóriu, ktorá by mala byť v súlade s bunkovými charakteristikami uvedenými v literatúre.

▼M7

Príprava kultúr

Bunkové línie: bunky sa rozmnožujú zo zásobných kultúr, nasadia sa do rastového média v takej hustote, aby u buniek v suspenziách alebo v monovrstvách pokračoval exponenciálny rast až do odberu (napr. malo by sa zabrániť zhlukovaniu v prípade buniek rastúcich v monovrstvách).

Lymfocyty: celá krv ovplyvnená antikoagulantom (napríklad. heparínom) alebo separované lymfocyty sa kultivujú (napr. 48 hodín v prípade ľudských lymfocytov) za prítomnosti mitogénu [napr. fytohemaglutinínu (PHA) v prípade ľudských lymfocytov], aby sa vyvolalo bunkové delenie pred vystavením testovanej chemikálii a cytoB.

Metabolická aktivácia

Ak sa použijú bunky s nedostatočnou endogénnou metabolickou kapacitou, mali by sa použiť exogénne systémy metabolickej aktivácie. Najpoužívanejším systémom, ktorý sa štandardne odporúča, pokiaľ nie je odôvodnené použitie iného systému, je postmitochondriálna frakcia obohatená o kofaktor (S9), pripravená z pečene hlodavcov (zvyčajne potkanov) ovplyvnených prípravkami na indukciu enzýmov, ako je Aroclor 1254 (56) (57), alebo zmes fenobarbitalu a beta-naftoflavónu (58) (59) (60). Použitie uvedenej zmesi nie je v rozpore so Štokholmským dohovorom o perzistentných organických látkach (61) a preukázalo sa, že táto zmes je rovnako účinná pri indukcii oxidáz so zmiešanou funkciou ako Aroclor 1254 (58) (59) (60). Frakcia S9 sa v konečnom testovacom médiu zvyčajne používa v koncentráciách od 1 obj. % do 2 obj. %, môže sa však zvýšiť až na 10 obj. %. V priebehu ovplyvňovania by sa nemali používať produkty, ktoré znižujú mitotický index, najmä vápnik-viažuce produkty (činidlá) (62). Výber typu a koncentrácie použitého exogénneho systému metabolickej aktivácie alebo metabolického induktora môže ovplyvniť trieda testovaných chemikálií.

Príprava testovanej chemikálie

Tuhé testované chemikálie by sa mali pred ovplyvnením buniek vo vhodnom rozpúšťadle rozpustiť a prípadne rozriediť. Kvapalné testované chemikálie možno pridať priamo do testovacieho systému a/alebo pred ovplyvnením rozriediť. Plynné alebo prchavé testované chemikálie by sa mali testovať pomocou náležite upravených štandardných protokolov, ako je napríklad ovplyvňovanie v uzatvorených nádobách (63) (64) (65). Prípravky testovanej chemikálie by sa mali pripraviť bezprostredne pred ovplyvňovaním, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na prijateľnosť uskladnenia.

Podmienky testu

Rozpúšťadlá

Rozpúšťadlo by sa malo zvoliť tak, aby optimalizovalo rozpustnosť testovaných chemikálií bez toho, aby nepriaznivo ovplyvňovalo vykonávanie skúšky, napr. menilo rast buniek, ovplyvňovalo integritu testovanej chemikálie, reagovalo s kultivačnými nádobami, narúšalo systém metabolickej aktivácie. Odporúča sa, pokiaľ je to možné, najskôr zvážiť použitie vodného rozpúšťadla (alebo rastového média). Osvedčenými rozpúšťadlami sú voda alebo dimetylsulfoxid (DMSO). Organické rozpúšťadlá by všeobecne nemali presiahnuť 1 obj. %. Ak sa cytoB rozpustí v DMSO, celkové množstvo organického rozpúšťadla použitého na testovanú chemikáliu aj na cytoB by nemalo presiahnuť 1 obj. %, v opačnom prípade by sa mali použiť čisté kontroly, aby sa zabezpečilo, že

▼M7

uvedený percentuálny podiel organického rozpúšťadla nebude mať nepriaznivý účinok. Vodné rozpúšťadlá (fyziologický roztok alebo voda) by v konečnom testovacom médiu nemali presiahnuť 10 obj. %. Ak sa použijú iné ako osvedčené rozpúšťadlá (napr. etanol alebo acetón), ich použitie by malo byť podložené údajmi o ich kompatibilite s testovanou chemikáliou a testovacím systémom a o tom, že v použitej koncentrácii nie sú genotoxické. V prípade, že také údaje neexistujú, je dôležité zaradiť čisté kontroly (pozri dodatok 1), ako aj kontrou rozpúšťadla s cieľom preukázať, že zvolené rozpúšťadlo nevyvoláva škodlivé účinky ani účinky na chromozómy (napr. aneuploidiu alebo klastogenicitu).

Použitie cytoB ako blokátora cytokinézy

Jedným z najdôležitejších faktorov pri vykonávaní testu MNvit je zabezpečenie toho, aby v bunkách, ktoré sa hodnotia, prebehla mitóza počas ovplyvňovania alebo v inkubačnej dobe po ovplyvňovaní, ak sa použije. Preto by sa hodnotenie výskytu mikrojadier malo obmedziť len na bunky, ktoré prešli mitózou počas ovplyvňovania alebo po ňom. CytoB je najbežnejšie používané činidlo na blokovanie cytokinézy, pretože potláča tvorbu aktínu, a tým zabraňuje oddeľovaniu dcérskych buniek po mitóze, čo vedie k vytváraniu dvojjadrových buniek (6) (66) (67). Pri použití cytoB možno simultánne merať účinok testovanej chemikálie na kinetiku proliferácie buniek. CytoB by sa mal používať ako blokátor cytokinézy pri použití ľudských lymfocytov, pretože medzi rôznymi darcami budú dĺžky bunkových cyklov variabilné, a takisto preto, že nie všetky lymfocyty budú reagovať na stimuláciu PHA. Použitie cytoB nie je povinné pri iných typoch buniek, ak možno určiť, že prešli delením, ako sa opisuje v bode 27. CytoB sa okrem toho zvyčajne nepoužíva, ak sa vzorky hodnotia na mikrojadrá metódami prietokovej cytrometrie.

Vhodnú koncentráciu cytoB by laboratórium malo stanoviť pre každý druh buniek, aby sa dosiahla optimálna frekvencia dvojjadrových buniek v kultúrach s kontrolou rozpúšťadla, a malo by sa preukázať, že pri tejto koncentrácii je k dispozícii dostatočné množstvo dvojjadrových buniek na hodnotenie. Vhodná koncentrácia cytoB je zvyčajne od 3 do 6 μg/ml (19).

Meranie proliferácie buniek a cytotoxicity a výber expozičných koncentrácií

Pri stanovovaní najvyššej koncentrácie testovanej chemikálie by sa nemali používať koncentrácie, ktoré majú schopnosť vyvolať falošné pozitívne reakcie, ako napríklad tie, ktoré spôsobujú nadmernú cytotoxicitu (pozri bod 29), zrážanie v rastovom médiu (pozri bod 30) alebo výrazné zmeny pH alebo osmolality (pozri bod 9). Ak testovaná chemikália v čase, keď sa pridáva, spôsobuje výraznú zmenu pH média, mohlo by sa pH upraviť tlmivým roztokom do konečného testovacieho média tak, aby nedošlo k falošným pozitívnym výsledkom a aby sa zachovali vhodné kultivačné podmienky.

Merania bunkovej proliferácie sa vykonávajú s cieľom zabezpečiť, aby dostatočný počet ovplyvnených buniek prešiel mitózou počas testovania a aby sa ovplyvňovania vykonávali pri vhodných úrovniach cytotoxicity (bozri bod 29). Cytotoxicita by sa mala stanoviť v hlavnom pokuse s metabolickou aktiváciou a bez nej, pričom sa použije vhodná indikácia bunkovej smrti a rastu buniek (pozri body 26 a 27). Hoci hodnotenie cytotoxicity pri počiatočnom predbežnom teste môže byť užitočné na lepšie vymedzenie koncentrácií, ktoré sa majú použiť v hlavnom pokuse, počiatočný test nie je povinný. Ak sa vykoná, nemal by nahrádzať meranie cytotoxicity v hlavnom pokuse.

Ovplyvňovanie kultúr s cytoB a meranie relatívnych frekvencií jednojadrových, dvojjadrových a viacjadrových buniek v kultúre predstavuje presnú metódu kvantifikácie účinkov na bunkovú proliferáciu a cytotoxického alebo cytostatického pôsobenia pri ovplyvňovaní (6) a zabezpečuje, že sa mikroskopicky hodnotia len bunky, ktoré sa delili počas ovplyvňovania alebo po ňom. Proliferačný

▼M7

index blokovania cytokinézy (CBPI) (6) (27) (68) alebo index replikácie (RI) minimálne z 500 buniek na kultúru (pozri vzorce v dodatku 2) sa odporúčajú na odhad cytotoxického alebo cytostatického pôsobenia pri ovplyvňovaní porovnaním hodnôt v ovplyvňovaných kultúrach a kontrolných kultúrach. Užitočné informácie by mohlo poskytnúť aj posúdenie ďalších ukazovateľov cytotoxicity (napr. integrita buniek, apoptóza, nekróza, počítanie metafáz, bunkový cyklus), tieto ukazovatele by sa však nemali používať namiesto CBPI alebo RI.

V štúdiách bez použitia cytoB je potrebné preukázať, že bunky v kultúre sa rozdelili, takže podstatná časť z hodnotených buniek prešla delením počas ovplyvňovania testovanou chemikáliou alebo po ňom, inak môžu nastať falošné negatívne reakcie. Na odhad cytotoxického a cytostatického pôsobenia pri ovplyvňovaní sa odporúča vykonať meranie relatívneho zdvojenia populácie (RPD) alebo relatívneho zvýšenia počtu buniek (RICC) (17) (68) (69) (70) (71) (pozri vzorce v dodatku 2). Pri predĺžených časoch odberu vzoriek (napr. ovplyvňovanie počas obdobia zodpovedajúceho 1,5 až 2-násobku dĺžky bežného bunkového cyklu a odber po ďalšom období zodpovedajúcom 1,5 až 2-násobku dĺžky bežného bunkového cyklu, čo celkovo vedie k odberom dlhším než 3 až 4-násobok dĺžky bežného bunkového cyklu, ako sa opisuje v bodoch 38 a 39) by použitie RPD mohlo viesť k podhodnotenému odhadu cytotoxicity (71). Za týchto okolností by meranie RICC mohlo predstavovať lepšiu alternatívu alebo by bolo užitočné vykonať odhad na základe hodnotenia cytotoxicity po období zodpovedajúcom 1,5 až 2-násobku dĺžky bežného bunkového cyklu. Ďalšie užitočné informácie by mohlo poskytnúť aj posúdenie ostatných markerov cytotoxicity alebo cytostázy (napr. integrita buniek, apoptóza, nekróza, počítanie metafáz, proliferačný index (PI), bunkový cyklus, nukleoplazmatické mosty alebo jadrové zárodky), nemali by sa však používať namiesto RPD alebo RICC.

Mali by sa vyhodnotiť aspoň tri testovacie koncentrácie (bez rozpúšťadla a pozitívnych kontrol), ktoré spĺňajú kritéria prijateľnosti (vhodná cytotoxicita, počet buniek atď.). Bez ohľadu na typy buniek (bunkové línie alebo primárne kultúry lymfocytov) možno pri každej testovacej koncentrácii použiť replikát alebo jednu ovplyvnenú kultúru. Hoci sa odporúča použitie duplicitných kultúr, akceptovateľná je aj jedna kultúra za predpokladu, že sa v takejto jednej kultúre alebo v duplicitných kultúrach hodnotí rovnaký celkový počet buniek. Použitie jednej kultúry je relevantné najmä v prípade, že sa posudzujú viac než 3 koncentrácie (pozri body 44 – 45). Výsledky získané z nezávislých kultúr použitých na opakovanie pri danej koncentrácii možno na účely analýzy údajov zlúčiť. V prípade testovaných chemikálií, ktoré vykazujú malú alebo nevykazujú žiadnu cytotoxicitu, budú za bežných okolností vhodné približne dvojnásobné až trojnásobné intervaly koncentrácií. Ak dôjde k cytotoxicite, mali by zvolené testovacie koncentrácie pokrývať rozpätie počnúc koncentráciou vyvolávajúcou cytotoxicitu, ako sa opisuje v bode 29, až po koncentrácie, pri ktorých dochádza k miernej a malej, alebo nedochádza k žiadnej cytotoxicite. Mnohé testované chemikálie vykazujú strmé krivky závislosti reakcie od koncentrácie a s cieľom získať údaje pri nízkej a miernej cytotoxicite alebo podrobne preštudovať závislosť reakcie od dávky bude potrebné zvoliť menšie rozdiely medzi jednotlivými koncentráciami a/alebo viac než tri koncentrácie (pre jednu kultúru alebo replikáty), a to najmä v situáciách, kedy sa vyžadujú opakované pokusy (pozri bod 60).

Ak vychádza maximálna koncentrácia z cytotoxicity, mala by byť najvyššia koncentrácia taká, aby sa dosiahlo 55 ± 5 % cytotoxicity pri použití odporúčaných parametrov cytotoxicity (t. j. zníženie RICC a RPD v prípade bunkových línií, ak sa nepoužije cytoB, a zníženie CBPI alebo RI, ak sa použije cytoB, na 45 ± 5 % v prípade súbežnej negatívnej kontroly) (72). Je potrebné prihliadnuť na to, aby sa interpretovali len tie pozitívne výsledky, ktoré sú zistené pri vyššej hranici tohto 55 ± 5 % rozsahu cytotoxicity (71).

▼M7

V prípade slabo rozpustných testovaných chemikálií, ktoré nie sú cytotoxické pri koncentráciách nižších, než je najnižšia nerozpustná koncentrácia, by najvyššia analyzovaná koncentrácia mala na konci ovplyvňovania testovanou chemikáliou vyvolať zakalenie alebo zrazeninu viditeľnú voľným okom alebo pomocou inverzného mikroskopu. Dokonca aj v prípadoch, kedy k cytotoxicite dochádza pri koncentráciách vyšších, než je najnižšia nerozpustná koncentrácia, sa odporúča testovať len jednu koncentráciu indukujúcu zakalenie alebo viditeľnú zrazeninu, pretože vznik zrazeniny môže viesť k falošným účinkom. Pri koncentrácii, ktorá vedie k vzniku zrazeniny, je potrebné zabezpečiť, aby zrazenina neovplyvnila priebeh testovania (napr. farbenia alebo hodnotenia). Môže byť užitočné pred pokusom stanoviť rozpustnosť v rastovom médiu.

Ak sa nezistí zrazenina alebo obmedzujúca cytotoxicita, mala by najvyššia testovacia koncentrácia zodpovedať 10 mM, 2 mg/ml alebo 2 µl/ml, podľa toho, ktorá z uvedených hodnôt je najnižšia (73) (74) (75). Pokiaľ testovaná chemikália nemá stanovené zloženie, ako je to napr. v prípade látok neznámeho alebo variabilného zloženia, produktov komplexných reakcií alebo biologických materiálov (UVCB) (76), prírodných extraktov atď., je možné, že najvyššia koncentrácia bude musieť byť pri nedostatočnej cytotoxicite vyššia (napr. 5 mg/ml), aby sa zvýšila koncentrácia každej zložky. Treba však poznamenať, že v prípade humánnych liekov sa tieto požiadavky môžu líšiť (93).

Kontroly

Pri každom odbere by sa mali zahrnúť súbežné negatívne kontroly (pozri bod 21), ktoré pozostávajú zo samotného rozpúšťadla v testovacom médiu a ktoré sú spracované rovnakým spôsobom ako ovplyvňované kultúry.

Na preukázanie schopnosti laboratória identifikovať klastogény a aneugény za podmienok použitého testovacieho protokolu a účinnosti exogénneho systému metabolickej aktivácie (ak sa používa) sú nutné súbežné pozitívne kontroly. Príklady pozitívnych kontrol sú uvedené v tabuľke 1 ďalej v texte. V odôvodnených prípadoch môžu byť na pozitívnu kontrolu použité alternatívne chemikálie.

V súčasnej dobe nie sú známe žiadne aneugény, ktoré by si k svojej genotoxickej aktivite vyžadovali metabolickú aktiváciu (17). Keďže testy na cicavčích bunkách *in vitro* na zistenie genetickej toxicity sú pri krátkodobých ovplyvňovaniach vykonávaných súbežne s metabolickou aktiváciou a bez nej a pri rovnakom čase ovplyvňovania dostatočne štandardizované, možno použitie pozitívnych kontrol obmedziť na testovanie klastogénu vyžadujúceho metabolickú aktiváciu. V tomto prípade preukáže jednoduchá odpoveď na pozitívnu klastogénnu kontrolu činnosť systému metabolickej aktivácie, ako aj vnímavosť testovacieho systému. Dlhodobé ovplyvňovanie (bez S9) by však malo mať svoju vlastnú pozitívnu kontrolu, keďže dĺžka ovplyvňovania sa bude líšiť od dĺžky testovania s použitím metabolickej aktivácie. Ak sa ako jediná pozitívna kontrola pri krátkodobom ovplyvňovaní s metabolickou aktiváciou a bez nej zvolí klastogén, mal by sa pre dlhodobé ovplyvňovanie bez metabolickej aktivácie zvoliť aneugén. Pozitívne kontroly na klastogenicitu aj aneugenicitu by sa mali použiť v prípade buniek s metabolickou kapacitou, ktoré si nevyžadujú S9.

Každá pozitívna kontrola by sa mala použiť pri jednej alebo viacerých koncentráciách, pri ktorých sa očakáva, že poskytnú reprodukovateľný a detegovateľný nárast nad hodnoty v pozadí, aby sa preukázala citlivosť testovacieho systému (t. j. účinky sú jasné, ale neodhalia okamžite identitu kódovaných preparátov pri odčítaní), a reakciu by nemala rušiť cytotoxicita presahujúca hraničné hodnoty stanovené v tejto testovacej metóde.

▼M7

Tabuľka 1

Referenčné chemikálie odporúčané na posúdenie spôsobilosti laboratória a na výber pozitívnych kontrol

Kategória	Chemikália	CAS číslo
1. **Klastogény aktívne bez metabolickej aktivácie**		
	metylmetánsulfonát	66-27-3
	mitomycín C	50-07-7
	4-nitrochinolín-N-oxid	56-57-5
	cytozín arabinozid	147-94-4
2. **Klastogény vyžadujúce metabolickú aktiváciu**		
	benzo[a]pyrén	50-32-8
	cyklofosfamid	50-18-0
3. **Aneugény**		
	kolchicín	64-86-8
	vinblastín	143-67-9

POSTUP

Harmonogram ovplyvňovania

S cieľom maximalizovať pravdepodobnosť detekcie aktivity aneugénu alebo klastogénu v špecifickom štádiu bunkového cyklu je dôležité, aby bol testovanej chemikálii vystavený dostatočný počet buniek reprezentujúcich všetky rôzne štádiá bunkových cyklov. Všetky ovplyvňovania by sa mali začať a skončiť v čase exponenciálneho rastu buniek a tento rast by mal pokračovať až do odberu. Harmonogram ovplyvňovania v prípade bunkových línií a primárnych bunkových kultúr sa teda môže určitým spôsobom odlišovať od harmonogramu ovplyvňovania v prípade lymfocytov, ktoré si vyžadujú stimuláciu mitogénom na to, aby sa začal ich bunkový cyklus (17). V prípade lymfocytov je najúčinnejšie začať ovplyvňovanie testovanou chemikáliou 44 – 48 hodín po stimulácii PHA, kedy sa bunky budú deliť asynchronicky (6).

Publikované údaje (19) naznačujú, že väčšina aneugénov a klastogénov sa určí na základe krátkodobého ovplyvňovania trvajúceho 3 až 6 hodín s použitím S9 a bez použitia S9, po ktorom nasleduje odstránenie testovanej chemikálie a odber v období zodpovedajúcom 1,5 až 2,0-násobku dĺžky bežného bunkového cyklu po začatí ovplyvňovania (7).

Na dôkladné vyhodnotenie, ktoré by bolo potrebné, aby bolo možné vyvodiť záver o negatívnom výsledku, by však mali byť zrealizované všetky tri nasledujúce podmienky pokusu s použitím krátkodobého ovplyvňovania s metabolickou aktiváciou a bez nej a dlhodobého ovplyvňovania bez metabolickej aktivácie (pozri body 56, 57 a 58):

— bunky by mali byť vystavené testovanej chemikálii bez metabolickej aktivácie počas 3 – 6 hodín a vzorky z nich by sa mali odobrať v čase rovnajúcom sa približne 1,5 – 2,0-násobku dĺžky bežného bunkového cyklu po začatí ovplyvňovania (19),

— bunky by mali byť vystavené testovanej chemikálii s metabolickou aktiváciou počas 3 – 6 hodín a vzorky z nich by sa mali odobrať v čase rovnajúcom sa približne 1,5 – 2,0-násobku dĺžky bežného bunkového cyklu po začatí ovplyvňovania (19),

▼M7

— bunky by mali byť nepretržite vystavené testovanej chemikálii bez metabolickej aktivácie až do odberu v čase, ktorý zodpovedá 1,5 – 2-násobku dĺžky bežného bunkového cyklu.

V prípade, že niektorá z uvedených podmienok pokusu vedie k pozitívnej reakcii, je možné, že nebude potrebné skúmať žiaden iný režim ovplyvňovania.

Ak je známe alebo ak existuje podozrenie, že testovaná chemikália ovplyvňuje dĺžku bunkového cyklu (napr. pri testovaní analógov nukleozidu), najmä u p53-kompetentných buniek (35) (36) (77), možno čas odberu vzoriek alebo čas obnovy kultúr predĺžiť o ďalšie obdobie zodpovedajúce maximálne 1,5 – 2,0-násobku dĺžky bežného bunkového cyklu (t. j. celkovo 3,0 – 4,0-násobok dĺžky bunkového cyklu po začatí krátkodobého a dlhodobého ovplyvňovania). Tieto možnosti sú určené pre situácie, kedy môžu vzniknúť obavy týkajúce sa možných interakcií medzi testovanou chemikáliou a cytoB. Pri použití predĺžených časov odberu vzoriek (t. j. celkovo na obdobie zodpovedajúce 3,0 – 4,0-násobku dĺžky bunkového cyklu kultúr) treba zabezpečiť, aby v tomto čase stále prebiehalo aktívne delenie buniek. Napríklad v prípade lymfocytov môže exponenciálny rast v čase 96 hodín po stimulácii klesať a bunkové kultúry v monovrstvách môžu začať splývať.

Navrhované harmonogramy ovplyvňovania pre bunky sú zhrnuté v tabuľke 2. Tieto všeobecné harmonogramy ovplyvňovania možno upravovať (ak je to odôvodnené) v závislosti od stability alebo reaktivity testovanej chemikálie alebo osobitných rastových charakteristík použitých buniek.

Tabuľka 2

Časy ovplyvňovania a odberu vzoriek buniek v rámci testu MNvit

Lymfocyty, primárne bunky a bunkové línie ovplyvnené s cytoB	+ S9 krátke ovplyvňovanie	ovplyvňovanie počas 3 – 6 hodín za prítomnosti S9; odstránenie S9 a testovacieho média; pridanie čerstvého média a cytoB; odber po uplynutí času zodpovedajúceho 1,5 až 2,0-násobku dĺžky bežného bunkového cyklu po začatí ovplyvňovania.
	– S9 krátke ovplyvňovanie	ovplyvňovanie počas 3 – 6 hodín; odstránenie testovacieho média; pridanie čerstvého média a cytoB; odber po uplynutí času zodpovedajúceho 1,5 až 2,0-násobku dĺžky bežného bunkového cyklu po začatí ovplyvňovania.
	– S9 predĺžené ovplyvňovanie	ovplyvňovanie počas času zodpovedajúceho 1,5 až 2-násobku dĺžky bežného bunkového cyklu za prítomnosti cytoB; odber na konci času ovplyvňovania.
Bunkové línie ovplyvnené bez cytoB (Harmonogramy sú identické s harmonogramami ovplyvňovania uvedenými vyššie s výnimkou toho, že sa nepridáva cytoB).		

Na konci ovplyvňovania, ktoré trvá 3 – 6 hodín, sa v monovrstvových kultúrach môžu vyskytovať mitotické bunky (ktoré sú identifikovateľné ako okrúhle a oddeľujúce sa od povrchu). Keďže tieto mitotické bunky sa ľahko oddeľujú, môžu sa pri odstraňovaní média obsahujúceho testovanú chemikáliu stratiť. Ak existuje dôkaz o podstatnom náraste počtu mitotických buniek v porovnaní s kontrolami, čo indikuje pravdepodobné zastavenie mitózy, v čase odberu by sa bunky mali zhromaždiť odstredením a pridať späť do kultúry, aby sa zabránilo strate buniek, u ktorých prebieha mitóza a hrozí, že dôjde k vzniku mikrojadier/chromozómovej aberácii.

▼M7

Odber buniek a príprava preparátov

Z každej kultúry by sa bunky mali odoberať a spracúvať zvlášť. Príprava buniek môže zahŕňať hypotonizáciu, tento krok však nie je potrebný, ak sa dosiahne primerané rozšírenie buniek iným spôsobom. Pri príprave preparátov možno použiť rôzne techniky za predpokladu, že sa zabezpečí vysoká kvalita bunkových preparátov na účely vyhodnocovania. Bunky s neporušenou bunkovou membránou a neporušenou cytoplazmou by sa mali uchovať, aby bolo možné zistiť mikrojadrá a (pri použití metódy s blokovaním cytokinézy) spoľahlivo identifikovať dvojjadrové bunky.

Preparáty možno farbiť pomocou rôznych metód, ako je Giemsa alebo fluorescenčné farbivá so špecifickou väzbou na DNA. Použitie vhodných fluorescenčných farbív [napr. akridínová oranž (78) alebo Hoechst 33258 plus pyronin-Y (79)] môže eliminovať niektoré umelo vzniknuté štruktúry spojené s používaním farbiva bez špecifickej väzby na DNA. Ak je potrebné získať mechanistické informácie o tvorbe mikrojadier, možno na identifikáciu ich obsahu použiť protilátky proti kinetochorom, FISH s pancentromérovými sondami DNA alebo značenie *in situ* pomocou primerov špecifických pre pancentroméru spolu s vhodným DNA – kontrastným farbiacim roztokom (celé chromozómy sa zafarbia, zatiaľ čo acentrické fragmenty chromozómov sa nezafarbia) (16) (17). Na odlíšenie klastogénov od aneugénov možno použiť aj iné metódy, pokiaľ sa preukázali ako účinné a boli validované. Napríklad v prípade určitých bunkových línií by sa užitočné informácie mohli získať meraním jadier sub-2N ako hypodiploidných javov použitím takých techník, ako je analýza obrazu, laserová skenovacia cytometria alebo prietoková cytometria (80) (81) (82). Morfologické pozorovanie jadier by takisto mohlo poskytnúť indikácie možnej aneuploidie. Okrem toho test chromozómových aberácií v metafáze vykonaný najlepšie na tom istom type buniek a podľa protokolu s porovnateľnou citlivosťou by mohol byť takisto užitočný na stanovenie toho, či sú mikrojadrá dôsledkom zlomov chromozómov (keďže je známe, že strata chromozómov by sa v teste na chromozómovú aberáciu nezistila).

Analýza

Všetky preparáty vrátane preparátov z rozpúšťadiel na kontrolu a neovplyvnených (ak sa použijú) a pozitívnych kontrol by sa pred mikroskopickou analýzou frekvencií mikrojadier mali jednotlivo označiť kódom. V prípade automatizovaného systému hodnotenia by sa mali použiť vhodné techniky, ako je napr. prietoková cytometria, laserová skenovacia cytometria alebo analýza obrazu, aby boli skreslenia a posuny pod kontrolou. Bez ohľadu na to, či sa pri vyčíslení mikrojadier používa automatizovaná platforma, mali by sa súbežne posudzovať hodnoty CBPI, RI, RPD alebo RICC.

V prípade kultúr ovplyvnených cytoB by sa mali analyzovať frekvencie výskytu mikrojadier aspoň v prípade 2 000 dvojjadrových buniek na každú koncentráciu a každú kontrolu (83), ktoré sa rovnomerne rozdelia medzi replikátmi, ak sa replikáty použijú. V prípade, že sa použije jedna kultúra na každú dávku (pozri bod 28), by sa malo vyhodnotiť aspoň 2 000 dvojjadrových buniek na každú kultúru v rámci tejto jednej kultúry (83). Ak je na hodnotenie pri každej koncentrácii k dispozícii podstatne menej než 1 000 dvojjadrových buniek z každej kultúry (v prípade duplicitných kultúr), alebo 2 000 (v prípade jednej kultúry) a nezistí sa významný nárast výskytu mikrojadier, test by sa mal zopakovať s použitím väčšieho počtu buniek alebo pri menších cytotoxických koncentráciách, podľa toho, ktorá z týchto dvoch možností je vhodná. Je potrebné zabezpečiť, aby sa nehodnotili dvojjadrové bunky, ktoré majú nepravidelný tvar alebo ktorých jadrá sa veľkosťou výrazne odlišujú. Okrem toho dvojjadrové bunky by sa nemali mylne zamieňať s nedostatočne rozšírenými viacjadrovými bunkami. Bunky obsahujúce viac než dve hlavné jadrá by sa nemali analyzovať na prítomnosť mikrojadier, keďže základná frekvencia mikrojadier môže byť v týchto

▼M7

bunkách vyššia (84). Hodnotenie jednojadrových buniek je prijateľné vtedy, ak sa preukáže, že testovaná chemikália zasahuje do pôsobenia cytoB. V takých prípadoch by mohlo byť užitočné zopakovať test bez CytoB. Hodnotenie jednojadrových buniek spolu s hodnotením dvojjadrových buniek by mohlo poskytnúť užitočné informácie (85) (86), nie je však povinné.

V bunkových líniách bez ovplyvnenia pomocou cytoB by sa mali mikrojadrá hodnotiť aspoň v prípade 2 000 buniek na koncentráciu a kontrolu (83), ktoré sa rovnomerne rozdelia medzi replikátmi, ak sa replikáty použijú. V prípade, že sa použije jedna kultúra na koncentráciu (pozri bod 28), by sa malo vyhodnotiť aspoň 2 000 buniek na každú kultúru v rámci tejto jednej kultúry. Ak je na hodnotenie pri každej koncentrácii k dispozícii podstatne menej než 1 000 buniek na kultúru (v prípade duplicitných kultúr), alebo 2 000 (v prípade jednej kultúry) a ak sa nezistí výrazný nárast výskytu mikrojadier, test by sa mal zopakovať s použitím väčšieho počtu buniek alebo pri menších cytotoxických koncentráciách, podľa toho, ktorá z týchto dvoch možností je vhodná.

Pri použití cytoB by sa mala určiť hodnota CBPI alebo RI na posúdenie bunkovej proliferácie (pozri dodatok 2) s použitím aspoň 500 buniek na kultúru. Ak sa ovplyvňovanie vykonáva bez prítomnosti cytoB, je nevyhnutné preukázať, že bunky v kultúre sa rozdelili, ako sa vysvetľuje v bodoch 24 až 28.

Spôsobilosť laboratória

Na to, aby sa pred vykonaním rutinného testu zistilo, či má laboratórium s danou skúškou dostatočné skúsenosti, malo by mať vykonanú sériu pokusov s referenčnými pozitívnymi chemikáliami pôsobiacimi prostredníctvom rôznych mechanizmov (aspoň jedna chemikália s metabolickou aktiváciou a jedna bez metabolickej aktivácie a jedna chemikália pôsobiaca prostredníctvom aneugénneho mechanizmu, pričom všetky sa vyberú zo zoznamu v tabuľke 1) a s rôznymi negatívnymi kontrolami (vrátane neovplyvnených kultúr a rôznych rozpúšťadiel/nosičov). Reakcie týchto pozitívnych a negatívnych kontrol by mali byť v súlade s príslušnou literatúrou. Tento postup sa nepoužije v prípade laboratórií, ktoré majú skúsenosti, t. j. ktoré majú k dispozícii databázu historických údajov, ako sa definuje v bodoch 49 až 52.

Mal by sa preskúmať celý rad vybratých chemikálií na pozitívnu kontrolu (pozri tabuľku 1) s krátkym a dlhým ovplyvňovaním za neprítomnosti metabolickej aktivácie, ako aj s krátkym ovplyvňovaním za prítomnosti metabolickej aktivácie, aby sa preukázala spôsobilosť zistiť klastogénne a aneugénne chemikálie, stanoviť účinnosť systému metabolickej aktivácie a preukázať vhodnosť postupov hodnotenia (mikroskopická vizuálna analýza, prietoková cytometria, laserová skenovacia cytometria alebo analýza obrazu). Rozsah koncentrácií by sa u vybraných chemikálií mal zvoliť tak, aby poskytol opakovateľné zvýšenia súvisiace s jednotlivými koncentráciami v porovnaní s úrovňou pozadia, aby sa tak preukázala citlivosť a dynamické rozpätie testovacieho systému.

Historické údaje na kontrolu

Laboratórium by malo určiť:

— rozsah a distribúciu historických pozitívnych kontrol,

— rozsah a distribúciu historických negatívnych kontrol (neovplyvnených, s rozpúšťadlom).

Pri prvom získavaní údajov súvisiacich s distribúciou historických negatívnych kontrol by súbežné negatívne kontroly mali byť v súlade s uverejnenými negatívnymi kontrolnými údajmi, ak takéto údaje existujú. S pridávaním ďalších údajov z pokusov k distribúcii kontrol by súbežné negatívne kontroly mali byť v ideálnom prípade v rámci 95 % regulačných medzí tejto distribúcie (87) (88). Databáza historických negatívnych kontrol laboratória by mala byť najskôr vytvorená na základe minimálne 10 pokusov, ale radšej by mala zahŕňať aspoň

▼M7

20 pokusov vykonaných za porovnateľných experimentálnych podmienok. Laboratóriá by mali použiť metódy kontroly kvality, ako sú regulačné diagramy [napr. tzv. „C-charts“ alebo „X-bar charts“ (88)], s cieľom zistiť variabilitu svojich údajov o pozitívnych a negatívnych kontrolách a preukázať, že metodika je v laboratóriu „pod kontrolou“ (83). Ďalšie odporúčania ako vytárať a využívať historické údaje (t. j. kritériá zaradenia údajov medzi historické údaje a ich vylúčenia z historických údajov a kritériá prijateľnosti v prípade daného pokusu) možno nájsť v literatúre (87).

Všetky zmeny v experimentálnom protokole by sa mali posúdiť z hľadiska konzistentnosti údajov s databázami existujúcich historických kontrol v laboratóriu. Každý väčší nesúlad by mal viesť k zavedeniu novej databázy historických kontrol.

Údaje o negatívnych kontrolách by mali zahŕňať výskyt buniek s mikrojadrami z jednej kultúry alebo zo súhrnu kultúr replikátov, ako sa opisuje v bode 28. Súbežné negatívne kontroly by v ideálnom prípade mali byť v rámci 95 % regulačných medzí distribúcie databázy historických negatívnych kontrol laboratória (87) (88). V prípade, že údaje o súbežných negatívnych kontrolách nespadajú do 95 % regulačných medzí, môžu byť prijateľné na zaradenie do distribúcie historických kontrol, pokiaľ tieto údaje nie sú extrémne mimo uvedených medzí a pokiaľ existujú dôkazy o tom, že testovací systém je „pod kontrolou“ (pozri bod 50) a dôkazy o tom, že nedošlo k technickému alebo ľudskému zlyhaniu.

PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Prezentovanie výsledkov

Ak sa použije metóda blokovania cytokinézy, pri hodnotení indukcie mikrojadier sa používajú iba frekvencie dvojjadrových buniek s mikrojadrami (bez ohľadu na počet mikrojadier v bunke). Hodnotenie počtu buniek s jedným mikrojadrom, s dvoma alebo viacerými mikrojadrami sa môže popisovať samostatne a mohlo by poskytnúť užitočné informácie, nie je však povinné.

Mali by sa stanoviť súbežné merania cytotoxicity a/alebo cytostázy pre všetky ovplyvnené kultúry a kultúry na negatívnu a pozitívnu kontrolu (16). Pri všetkých ovplyvnených kultúrach a kontrolných kultúrach by sa mali vypočítať hodnoty CBPI alebo RI ako merania oneskorenia bunkového cyklu pri použití metódy blokovania cytokinézy. V prípade, že sa nepoužíva cytoB, mali by sa použiť hodnoty RDP alebo RICC (pozri dodatok 2).

Mali by sa uvádzať údaje o jednotlivých kultúrach. Všetky údaje sa dodatočne sumarizujú v tabuľkovej forme.

Kritériá prijateľnosti

Prijateľnosť testu sa zakladá na týchto kritériách:

— súbežná negatívna kontrola sa považuje za prijateľnú na účely pridania do historickej databázy negatívnych kontrol laboratória, ako sa opisuje v bode 50,

— súbežné pozitívne kontroly (pozri bod 50) by mali vyvolať reakcie, ktoré sú zlúčiteľné s reakciami uvedenými v historickej databáze pozitívnych kontrol laboratória a v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou by mali viesť k štatisticky významnému nárastu,

— mali by byť splnené kritériá bunkovej proliferácie v kontrole rozpúšťadla (pozri body 25 – 27),

— pokiaľ jedna podmienka pokusu neviedla k pozitívnym výsledkom, mali by sa otestovať všetky podmienky pokusu (pozri body 36 – 40),

— je analyzovateľný primeraný počet buniek a koncentrácií (body 28 a 44 – 46),

▼M7

— kritériá výberu najvyššej koncentrácie sú v súlade s kritériami opísanými v bodoch 24 – 31.

Hodnotenie a interpretácia výsledkov

Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, sa testovaná chemikália pokladá za jasne pozitívnu, ak pri ktorejkoľvek z preskúmaných podmienok pokusu platí, že (pozri body 36 – 39):

— aspoň jedna z testovaných koncentrácií vykazuje štatisticky významné zvýšenie v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou (89),

— pri hodnotení pomocou vhodného testu trendu je tento nárast aspoň pri jednej testovacej podmienke závislý od dávky (pozri bod 28),

— ktorýkoľvek z výsledkov je mimo distribúcie historických údajov negatívnych kontrol (napr. 95 % regulačné medze podľa Poissonovho rozdelenia, pozri bod 52).

Ak sú splnené všetky tieto kritériá, testovaná chemikália sa pokladá za chemikáliu schopnú vyvolať chromozómové zlomy a/alebo zvýšenie či zníženie ich počtu v tomto testovacom systéme. Odporúčania týkajúce sa najvhodnejších štatistických metód možno takisto nájsť aj v literatúre (90) (91) (92).

Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, sa testovaná chemikália pokladá za jasne negatívnu, ak pri všetkých preskúmaných podmienkach pokusu platí, že (pozri body 36 – 39):

— žiadna z testovaných koncentrácií nevykazuje štatisticky významné zvýšenie v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

— hodnotenie pomocou vhodného testu trendu ukáže, že nedochádza k nárastu v závislosti od koncentrácie,

— všetky výsledky sú v rámci rozdelenia historických údajov negatívnych kontrol (napr. 95 % regulačné medze podľa Poissonovho rozdelenia, pozri bod 52).

Testovaná chemikália sa pokladá za chemikáliu neschopnú vyvolať chromozómové zlomy a/alebo zvýšenie či zníženie ich počtu v tomto testovacom systéme. Odporúčania týkajúce sa najvhodnejších štatistických metód možno takisto nájsť aj v literatúre (90) (91) (92).

Neexistuje požiadavka na potvrdenie jasnej pozitívnej alebo negatívnej reakcie.

V prípade, že reakcia nie je jasne negatívna ani jasne pozitívna, ako sa opisuje vyššie v texte, a/alebo s cieľom pomôcť pri stanovení biologickej relevantnosti výsledku by sa údaje mali vyhodnotiť na základe odborného posúdenia a/alebo ďalšieho skúmania. Užitočné by mohlo byť hodnotenie dodatočných buniek (v prípade potreby) alebo zopakovanie pokusu prípadne s použitím pozmenených podmienok pokusu [napr. odstup koncentrácií, iné podmienky metabolickej aktivácie (t. j. koncentrácia S9 alebo pôvod S9)].

V zriedkavých prípadoch neumožní súbor údajov ani po ďalšom skúmaní vyvodiť záver o pozitívnom alebo negatívnom výsledku, a preto sa pokus uzavrie ako pokus „s nejasným výsledkom“.

Testované chemikálie, ktoré v teste MNvit indukujú mikrojadrá, môžu mať tento účinok preto, že indukujú chromozómový zlom, ich stratu alebo kombináciu oboch javov. Na určenie toho, či je mechanizmus indukcie mikrojadier dôsledkom klastogénneho a/alebo aneugénneho pôsobenia možno použiť ďalšiu analýzu s použitím protilátok kinetochoru, sond *in situ* so špecifickou väzbou na centroméry alebo iných metód.

▼M7

Skúšobný protokol

Skúšobný protokol by mal obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— zdroj, číslo šarže, konečný dátum použitia, ak sú tieto informácie k dispozícii,

— stabilita testovanej chemikálie, ak je známa,

— reaktivita testovanej chemikálie s rozpúšťadlom/nosičom alebo médiom na kultiváciu buniek,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle, ak je známa,

— prípadné meranie pH, osmolality a zrazeniny v rastovom médiu, do ktorého bola pridaná testovaná chemikália.

Jednozložková látka:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, ako je názov IUPAC alebo názov CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak je to potrebné a uskutočniteľné, atď.

Mnohozložková látka, UVCB a zmesi:

— charakterizovaná pokiaľ možno chemickou identitou (pozri vyššie), kvantitatívnym výskytom a relevantnými fyzikálno-chemickými vlastnosťami zložiek.

Rozpúšťadlo:

— zdôvodnenie výberu rozpúšťadla,

— percentuálny podiel rozpúšťadla v konečnom rastovom médiu.

Bunky:

— typ a zdroj použitých buniek,

— vhodnosť použitého typu bunky,

— v prípade bunkových línií neprítomnosť mykoplazmy,

— v prípade bunkových línií informácie o dĺžke bunkového cyklu alebo proliferačný index,

— ak sa použijú lymfocyty, pohlavie darcov krvi, vek a všetky relevantné informácie o darcovi, informácie o tom či bola použitá celá krv alebo separované lymfocyty, použitý mitogén,

— trvanie bežného bunkového cyklu (pri negatívnej kontrole),

— v prípade bunkových línií počet pasážovaní, ak je k dispozícii,

— v prípade bunkových línií metódy udržiavania bunkových kultúr,

— v prípade bunkových línií modálny počet chromozómov.

▼**M7**

Podmienky testovania

— identita látky blokujúcej cytokinézu (napr. cytoB), ak sa použije, a jej koncentrácia a trvanie vystavenia buniek,

— koncentrácia testovanej chemikálie vyjadrená ako konečná koncentrácia v rastovom médiu (napr. v μg alebo mg/ml alebo mM rastového média),

— zdôvodnenie voľby koncentrácií a počtu kultúr vrátane údajov o cytotoxicite a obmedzeniach rozpustnosti,

— zloženie média, prípadne koncentrácia CO_2, hladina vlhkosti,

— koncentrácia (a/alebo objem) rozpúšťadla a testovanej chemikálie pridaných do rastového média,

— teplota a doba inkubácie,

— trvanie ovplyvňovania,

— čas odberu po ovplyvňovaní,

— prípadne hustota buniek pri naočkovaní média,

— typ a zloženie použitého systému metabolickej aktivácie [zdroj S9, metóda prípravy zmesi S9, koncentrácia alebo objem zmesi S9 a S9 v konečnom rastovom médiu, kontroly akosti S9, (napr. enzymatická aktivita, sterilita, metabolická schopnosť)],

— chemikálie na pozitívnu a negatívnu kontrolu, konečné koncentrácie, podmienky a trvanie ovplyvňovania a obdobia obnovy,

— metódy prípravy preparátov a použitá technika farbenia,

— kritéria hodnotenia buniek s mikrojadrami (výber analyzovateľných buniek a identifikácia mikrojadra),

— počty analyzovaných buniek,

— metódy merania cytotoxicity,

— akékoľvek doplňujúce informácie týkajúce sa cytotoxicity a použitej metódy,

— kritériá hodnotenia štúdií ako pozitívne, negatívne alebo s nejasným výsledkom,

— použitá(-é) metóda (-y) štatistickej analýzy,

— v uplatniteľnom prípade metódy, ako je napríklad použitie protilátok proti kinetochoru alebo špecifických pancentromérových sond na určenie toho, či mikrojadrá obsahujú celé alebo fragmentované chromozómy,

— metódy použité na určenie pH, osmolality a zrážania.

Výsledky:

— vymedzenie buniek prijateľných na analýzu,

— v prípade bunkových línií pri neprítomnosti cytoB počet ovplyvnených buniek a počet odobratých buniek v prípade každej kultúry,

▼M7

— použitý spôsob merania cytotoxicity, napr. CBPI alebo RI v prípade metódy blokovania cytokinézy, RICC alebo RPD v prípade, že sa metódy blokovania cytokinézy nepoužijú, prípadne pozorovania, ak existujú (napr. konfluencia buniek, apoptóza, nekróza, počítanie metafáz, frekvencia dvojjadrových buniek),

— známky zrážania a čas ich stanovenia,

— údaje o hodnotách pH a osmolality testovacieho média, ak sú stanovené,

— distribúcia jednojadrových, dvojjadrových a viacjadrových buniek, ak sa používa metóda blokovania cytokinézy,

— prípadne počet buniek s mikrojadrami uvedený osobitne pre každú ovplyvnenú kultúru a kontrolnú kultúru a určenie, či ide o dvojjadrové alebo jednojadrové bunky,

— ak je to možné, závislosť medzi koncentráciou a reakciou,

— údaje o súbežných negatívnych (rozpúšťadlo) a pozitívnych kontrolách (koncentrácie a rozpúšťadlá),

— historické údaje o negatívnych (rozpúšťadlo) a pozitívnych kontrolách s rozsahmi, priemernými hodnotami a štandardnou odchýlkou a 95 % regulačnými medzami pre rozdelenie, ako aj počet údajov,

— štatistické analýzy, hodnoty p, ak existujú.

Diskusia o výsledkoch

Záver

LITERATÚRA

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 antikinetochore 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. Chapter B.10 of this Annex: *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*.

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 Research*, Vol. 468/2, pp. 137-163.

30. Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 123-134.

31. Matsushima, T. *et al.* (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis*, Vol. 14/6, pp. 569-580.

32. Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 1-152.

33. Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Research*, Vol. 702/2, pp. 139-147.

34. Hashimoto K. *et al.* (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. Regulatory Toxicology and Pharmacology, Vol. 59/1, pp. 28-36.

35. Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 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, k dispozícii na webovej lokalite: 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. K dispozícii na webovej lokalite: 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. *Mutagenesi*s, 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). K dispozícii na webovej lokalite: 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. K dispozícii na požiadanie.

▼**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

Dodatok 1

DEFINÍCIE

Aneugén: akákoľvek chemikália alebo proces, ktoré pri interakcii so zložkami mitotického alebo meiotického aparátu bunkového cyklu vedie k aneuploidii v bunkách alebo organizmoch.

Aneuploidia: akákoľvek odchýlka od bežného diploidného (alebo haploidného) počtu chromozómov vo forme jedného alebo viacerých chromozómov, nie však vo forme celého(-ých) súboru(-ov) chromozómov (polyploidia).

Apoptóza: programovaná bunková smrť charakterizovaná sériou krokov, ktoré vedú k rozpadu buniek na telieska ohraničené membránou, ktoré sa následne fagocytujú alebo vypudzujú.

Proliferácia buniek: zvýšenie počtu buniek v dôsledku mitotického delenia buniek.

Centroméra: oblasť DNA chromozómu, v ktorej sa spájajú obe chromatídy a na ktorú sú vedľa seba pripojené oba kinetochory.

Chemikália: látka alebo zmes.

Koncentrácie: sú konečné koncentrácie testovanej chemikálie v rastovom médiu.

Klastogén: akákoľvek chemikália alebo jav, ktorý spôsobuje štruktúrne chromozómové aberácie v populáciách buniek alebo eukaryotických organizmoch.

Cytokinéza: proces delenia buniek, ktorý nasleduje ihneď po mitóze a v ktorom vznikajú dve dcérske bunky – každá s jedným jadrom.

Proliferačný index blokovania cytokinézy (CBPI): pomer druhého delenia buniek v ovplyvnenej populácii vo vzťahu k čistej kontrole (pozri vzorec v dodatku 2).

Cytostáza: inhibícia rastu buniek (pozri vzorec v dodatku 2).

Cytotoxicita: v prípade testov, na ktoré sa vzťahuje táto testovacia metóda a ktoré sa vykonávajú za prítomnosti cytochalasínu B, sa cytotoxicita označuje ako zníženie proliferačného indexu blokovania cytokinézy (CBPI) alebo indexu replikácie (RI) ovplyvnených buniek v porovnaní s negatívnou kontrolou (pozri bod 26 a dodatok 2).

Pri skúškach, na ktoré sa vzťahuje táto testovacia metóda a ktoré sa vykonávajú za neprítomnosti cytochalasínu B, sa cytotoxicita označuje ako zníženie relatívneho zdvojenia populácie (RPD) alebo relatívneho nárastu počtu buniek (RICC) ovplyvnených buniek v porovnaní s negatívnou kontrolou (pozri bod 27 a dodatok 2).

Genotoxický: všeobecný výraz, ktorý zahŕňa všetky typy poškodenia DNA alebo chromozómov vrátane zlomov, delécií, aduktov, modifikácií a prepojení nukleotidov, prestavieb, génových mutácií, chromozómových aberácií a aneuploidie. Nie všetky typy genotoxických účinkov majú za následok mutácie alebo trvalé poškodenie chromozómov.

Bunky v interfáze: bunky, ktoré nie sú v štádiu mitotického delenia.

Kinetochor: štruktúra obsahujúca proteíny, ktorá sa vytvára na centromére chromozómu a ku ktorej sa vlákna deliaceho vretienka pripájajú počas delenia buniek a umožňujú riadny pohyb dcérskych chromozómov k pólom dcérskych buniek.

▼M7

Mikrojadrá: malé jadrá doplňujúce hlavné jadrá buniek a existujúce oddelene od nich, ktoré sa vytvárajú počas telofázy mitózy alebo meiózy z oneskorených chromozómových fragmentov alebo celých chromozómov.

Mitóza: rozdelenie bunkového jadra, ktoré sa zvyčajne delí na profázu, prometafázu, metafázu, anafázu a telofázu.

Mitotický index: pomer buniek v metafáze vydelený celkovým počtom buniek pozorovaných v populácii buniek; udáva stupeň proliferácie buniek tejto populácie.

Mutagénny: produkujúci dedičnú zmenu sekvencie(-í) párov báz DNA v génoch alebo štruktúry chromozómov (chromozómové aberácie).

Nondisjunkcia: dej, pri ktorom sa spárované chromatídy riadne neoddelia a nerozdelia do vznikajúcich dcérskych buniek, čo vedie vzniku dcérskych buniek s abnormálnym počtom chromozómov.

Stav p53: proteín p53 sa zapája do regulácie bunkového cyklu, apoptózy a opravy DNA. Bunky s nedostatkom funkčného proteínu p53, ktoré nie sú schopné zastaviť bunkový cyklus alebo eliminovať poškodené bunky prostredníctvom apoptózy alebo iných mechanizmov (napr. indukciou opravy DNA) súvisiacich s funkciami p53 ako reakciu na poškodenie DNA, by mali byť teoreticky náchylnejšie na génové mutácie alebo chromozómové aberácie.

Polyploidia: numerické chromozómové aberácie v bunkách alebo organizmoch, ktoré zahŕňajú celý(-é) súbor(-y) chromozómov, na rozdiel od jedného chromozómu alebo jednotlivých chromozómov (aneuploidia).

Proliferačný index (PI): metóda merania cytotoxicity bez použitia cytoB (pozri vzorec v dodatku 2).

Relatívne zvýšenie počtu buniek (RICC): metóda merania cytotoxicity bez použitia cytoB (pozri vzorec v dodatku 2).

Relatívne zdvojenie populácie (RPD): metóda merania cytotoxicity bez použitia cytoB (pozri vzorec v dodatku 2).

Index replikácie (RI): pomer bunkových cyklov, ktoré boli dokončené v ovplyvnenej kultúre, vo vzťahu k čistej kontrole počas doby expozície a obnovy (pozri vzorec v dodatku 2).

Frakcia pečene S9: supernatant pečeňového homogenátu po 9 000 g odstredení, t. j. surový pečeňový extrakt.

Zmes S9: zmes frakcie pečene S9 a kofaktorov nepotrebných pre metabolickú aktiváciu enzýmov.

Kontrola rozpúšťadla: všeobecný termín na vymedzenie kontrolných kultúr, ku ktorým sa pridáva len rozpúšťadlo používané na rozpúšťanie testovanej chemikálie.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Čistá kontrola: kultúry, ktoré sa neovplyvňujú (t. j. ani testovanou chemikáliou ani rozpúšťadlom), ale sa spracovávajú súbežne rovnakým spôsobom ako kultúry, ku ktorým sa pridáva testovaná chemikália.

▼M7

Dodatok 2

VZORCE NA POSÚDENIE CYTOTOXICITY

Pri použití cytoB by hodnotenie cytotoxicity malo byť založené na **proliferačnom indexe blokovania cytokinézy (CBPI)** alebo na **indexe replikácie (RI)** (17) (69). CBPI udáva priemerný počet jadier na bunku a môže sa použiť na výpočet proliferácie buniek. RI udáva relatívny počet bunkových cyklov na bunku počas obdobia vystavenia cytoB v ovplyvnených kultúrach v porovnaní s kontrolnými kultúrami a možno ho použiť na percentuálny výpočet cytostázy:

$$\% \text{ cytostáza} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

a:

T = kultúra ovplyvnená testovanou chemikáliou

C = kontrolná kultúra,

pričom:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{počet jednojadrových buniek}) + (2 \times \text{počet dvojjadrových buniek}) + (3 \times \text{počet viacjadrových buniek}))}{(\text{celkový počet buniek})}$$

CBPI zodpovedajúci 1 (všetky bunky sú jednojadrové) sa teda rovná 100 % cytostáze.

Cytostáza = 100 – RI

$$\text{RI} = \frac{((\text{počet dvojjadrových buniek}) + (2 \times \text{počet viacjadrových buniek}))/(\text{celkový počet buniek})_T}{((\text{počet dvojjadrových buniek}) + (2 \times \text{počet viacjadrových buniek}))/(\text{celkový počet buniek})_C} \times 100$$

T = ovplyvnené kultúry

C = kontrolné kultúry

Hodnota RI zodpovedajúca 53 % teda znamená, že v porovnaní s počtami buniek, ktorých delením vznikli v kontrolnej kultúre dvojjadrové a viacjadrové bunky, len 53 % z tohto počtu sa delilo v ovplyvnenej kultúre, t. j. 47 % cytostáza.

Ak sa cytoB nepoužije, odporúča sa vykonať hodnotenie cytotoxicity na základe **relatívneho nárastu počtu buniek (RICC)** alebo **relatívneho zdvojenia populácie (RPD)** (69), keďže v oboch prípadoch sa zohľadňuje podiel populácie buniek, ktoré sa delili.

$$\textbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{nárast počtu buniek vovplyvnených kultúrach}(\text{konečný} - \text{počiatočný}))}{(\text{nárast počtu buniek vkontrolných kultúrach}(\text{konečný} - \text{počiatočný}))} \times 100$$

$$\textbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{počet zdvojení populácie vovplyvnených kultúrach})}{(\text{počet zdvojení populácie vkontrolných kultúrach})} \times 100$$

kde:

Zdvojenie populácie = [log (počet buniek po ovplyvnení ÷ počiatočný počet buniek)] ÷ log 2

Preto 53 % RICC alebo RDP indikuje 47 % cytotoxicitu/cytostázu.

▼**M7**

Pri použití **proliferačného indexu (PI)** možno cytotoxicitu hodnotiť pomocou počítania počtu klonov obsahujúcich jednu bunku (cl1), 2 bunky (cl2), 3 až 4 bunky (cl4) a 5 až 8 buniek (cl8).

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

PI sa používa ako hodnotný a spoľahlivý parameter cytotoxicity aj pri bunkových líniách kultivovaných *in vitro* bez použitia cytoB (35) (36) (37) (38) a môže sa pokladať za užitočný doplnkový parameter..

V každom prípade by počet buniek pred ovplyvnením mal byť rovnaký ako počet ovplyvnených kultúr a kultúr na negatívnu kontrolu.

Zatiaľ čo v minulosti sa RCC (*t. j.* počet buniek v ovplyvnených kultúrach/počet buniek v kontrolných kultúrach) používal ako parameter cytotoxicity, už sa neodporúča, pretože môže podhodnotiť cytotoxicitu.

Pri použití automatizovaných systémov hodnotenia, napríklad prietokovej cytometrie, laserovej skenovacej cytometrie alebo analýzy obrazu, možno počet buniek vo vzorci nahradiť počtom jadier.

V kultúrach na negatívnu kontrolu by zdvojenie populácie alebo index replikácie mali byť zlúčiteľné s požiadavkou na odber vzoriek z buniek po ovplyvnení v čase zodpovedajúcom približne 1,5 – 2-násobku dĺžky bežného bunkového cyklu.

▼M3

B. 50. **SENZIBILIZÁCIA KOŽE: LOKÁLNA SKÚŠKA LYMFATICKÝCH UZLÍN: DA**

ÚVOD

1. Usmernenia Organizácie pre hospodársku spoluprácu a rozvoj (OECD) na testovanie chemikálií a testovacie metódy EÚ sa pravidelne revidujú vzhľadom na vedecký pokrok, zmeny regulačných potrieb a dobré životné podmienky zvierat. Prvá testovacia metóda (TM) (B.42) na stanovenie senzibilizácie kože u myší, tzv. lokálna skúška lymfatických uzlín (LLNA; usmernenie OECD na vykonávanie testov 429), bola zrevidovaná (1). Podrobnosti validácie LLNA a revízia prác v tejto oblasti boli uverejnené (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Pri LLNA sa na meranie proliferácie lymfocytov používa rádioizotopický tymidín alebo jód, a preto má táto skúška obmedzené použitie v tých prípadoch, kde je problematické získavanie, použitie alebo likvidácia rádioaktívnych látok. LLNA: DA (vyvinutá spoločnosťou Daicel Chemical Industries, Ltd.) je nerádioaktívnou modifikáciou LLNA, ktorá kvantifikuje obsah adenozín-trifosfátu (ATP) prostredníctvom bioluminiscencie, ktorá je ukazovateľom proliferácie lymfocytov. LLNA: Testovacia metóda DA bola validovaná a zrevidovaná a odporúča ju medzinárodný panel pre partnerské preskúmanie ako užitočnú metódu na identifikáciu chemikálií spôsobujúcich alebo nespôsobujúcich senzibilizáciu kože s určitými obmedzeniami (10) (11) (12) (13). Táto testovacia metóda je vytvorená na posúdenie potenciálu chemikálií (látok a zmesí) spôsobiť senzibilizáciu kože u zvierat. Metóda opísaná v kapitole B.6 tejto prílohy a usmernení OECD na vykonávanie testov 406 využíva testy s morčatami, konkrétne maximalizačný test morčiat a Buehlerov test (14). LLNA (kapitola B.42 tejto prílohy; usmernenie OECD na vykonávanie testov 429) a dve nerádioaktívne modifikácie LLNA: DA (kapitola B.50 tejto prílohy; usmernenie OECD na vykonávanie testov 442 A) a LLNA: BrdU-ELISA (kapitola B.51 tejto prílohy; usmernenie OECD na vykonávanie testov 442 B) poskytujú výhodu v porovnaní s testami na morčatách opísanými v kapitole B.6 a usmernení OECD na vykonávanie testov 406 (14), a to pokiaľ ide o obmedzenie a zdokonalenie využívania zvierat.

2. Podobne ako LLNA, LNNA: DA skúma indukčnú fázu senzibilizácie kože a poskytuje kvantitatívne údaje vhodné na posúdenie odozvy na dávku. Okrem toho schopnosť identifikovať látky spôsobujúce senzibilizáciu kože bez potreby používania rádioaktívneho značenia DNA znižuje potenciál expozície rádioaktivite pri práci a problémy v súvislosti s likvidáciou odpadu. To môže následne umožniť zvýšené využívanie myší na identifikáciu látok spôsobujúcich senzibilizáciu kože, čo by ďalej mohlo znížiť využívanie morčiat na testovanie potenciálu senzibilizácie kože (t. j. B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (14).

VYMEDZENIE POJMOV

3. Použité definície sú uvedené v dodatku 1.

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

4. LLNA: DA je upravenou metódou LLNA na identifikáciu potenciálu chemikálií spôsobiť senzibilizáciu kože, ktorá má určité obmedzenia. Neznamená to nevyhnutne, že vo všetkých prípadoch sa má použiť LLNA: DA namiesto testu LLNA alebo testov s morčatami (t. j. metóda B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (14), ale skôr to, že táto skúška je rovnako hodnotná a môže sa použiť ako alternatíva, v ktorej pozitívne a negatívne výsledky vo všeobecnosti nevyžadujú ďalšie potvrdenie (10) (11). Testovacie laboratórium by malo posúdiť všetky dostupné informácie o testovanej látke pred uskutočnením štúdie. Takéto informácie budú obsahovať identitu a chemickú štruktúru testovanej látky,

▼M3

jej fyzikálno-chemické vlastnosti, výsledky všetkých ostatných *in vitro* alebo *in vivo* testov toxicity s testovanou látkou a toxikologické údaje o štruktúrne príbuzných chemikáliách. Tieto informácie treba vziať do úvahy pri určovaní, či LLNA: DA je pre testovanú látku vhodná [vzhľadom na nezlučiteľnosť obmedzených druhov chemikálií s LLNA: DA (pozri odsek 5)], a ako pomoc pri výbere dávok.

5. LLNA: DA je metóda *in vivo*, a to znamená, že pri hodnotení aktivity alergickej kontaktnej senzibilizácie sa nevylučuje používanie zvierat. Má však potenciál obmedziť používanie zvierat na tento účel pri porovnaní s testami na morčatách (B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (14). Okrem toho LLNA: DA ponúka značné zjemnenie spôsobu, akým sa zvieratá používajú na testy alergickej kontaktnej senzibilizácie (znižuje bolesť a utrpenie zvierat), keďže na rozdiel od metódy B.6 a usmernenia OECD na vykonávanie testov 406 LLNA: DA nevyžaduje, aby sa vyvolali reakcie dermálnej hypersenzitivity. Napriek výhodám, ktoré má LLNA: DA v porovnaní s metódou B.6 a usmernením OECD na vykonávanie testov 406 (14), existujú určité obmedzenia, ktoré by si mohli vyžadovať použiť metódu B.6 alebo usmernenie OECD na vykonávanie testov 406 [napr. testovanie určitých kovov, falošné pozitívne zistenia s určitými kožnými dráždivými látkami (ako napríklad niektoré povrchovo aktívne látky) (6) (1 a kapitola B.42 tejto prílohy), rozpustnosť testovanej látky]. Okrem toho chemické triedy alebo látky, ktoré obsahujú potenciálne zmätočné funkčné skupiny (16), si tiež môžu vyžadovať použitie testov s morčatami [t. j. B.6, usmernenie OECD na vykonávanie testov 406 (14)]. Obmedzenia, ktoré boli identifikované pre LLNA (1 a kapitola B.42 tejto prílohy), sa odporúčajú aj pre LLNA: DA (10). Okrem toho použitie LLNA: DA nemusí byť vhodné na testovanie látok, ktoré ovplyvňujú úrovne ATP (napr. látky, ktoré fungujú ako inhibítory ATP), alebo látok, ktoré ovplyvňujú presné meranie vnútrobunkového ATP (napr. prítomnosť enzýmov spôsobujúcich degradáciu ATP, prítomnosť ATP v mimobunkovom priestore lymfatickej uzliny). Okrem takto identifikovaných obmedzení by sa LLNA: DA mala uplatňovať pri testovaní všetkých látok okrem prípadov, keď tieto látky majú vlastnosti, ktoré by mohli narušať presnosť LLNA: DA. Okrem toho by sa mala zvážiť možnosť hraničných pozitívnych výsledkov v prípade, keď sa dosiahnu hodnoty stimulačného indexu (SI) od 1,8 do 2,5 (pozri odseky 31 a 32). To je založené na validačnej databáze 44 látok s použitím SI ≥ 1,8 (pozri odsek 6), pre ktoré LLNA: DA správne identifikovala 32 látok spôsobujúcich senzibilizáciu podľa LLNA, ale nesprávne identifikovala tri z 12 látok nespôsobujúcich senzibilizáciu podľa LLNA s hodnotami SI od 1,8 do 2,5 (t. j. hraničný pozitívny výsledok) (10). Keďže sa však na stanovenie hodnôt SI a výpočet predpokladaných vlastností testu použil rovnaký súbor údajov, stanovené údaje môžu byť nadhodnotením skutočných prediktívnych vlastností.

PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

6. Základným princípom, na ktorom sa LLNA: DA zakladá, je, že senzibilizátory vyvolávajú proliferáciu lymfocytov v lymfatickej uzline v drénovanom mieste aplikácie testovanej látky. Táto proliferácia je úmerná dávke a účinnosti aplikovaného alergénu a poskytuje jednoduchý prostriedok na získanie kvantitatívneho merania senzibilizácie. Proliferácia sa meria porovnávaním priemeru proliferácie v každej pokusnej skupine s priemerom proliferácie v kontrolnej skupine, ktorej sa podáva nosič (VC). Určí sa pomer priemernej proliferácie v každej ošetrenej skupine a priemernej proliferácie v súbežnej kontrolnej skupine s nosičom, ktorý sa označuje ako stimulačný index (SI) a mal by mať hodnotu ≥ 1,8 pred ďalším prípadným vyhodnotením testovanej látky ako potenciálneho senzibilizátora kože. Uvedené metódy sú

▼M3

založené na meraní obsahu ATP pomocou bioluminiscencie (ktoré koreluje s počtom živých buniek) (17) na preukázanie proliferácie zvýšeného počtu buniek v drénovaných ušných lymfatických uzlinách (18) (19). Metóda bioluminiscencie využíva enzým luciferáza na katalýzu tvorby svetla z ATP a luciferínu podľa tejto reakcie:

$$ATP + luciferin + O_2 \xrightarrow{Luciferase} oxyluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + svetlo$$

Intenzita vyžarovaného svetla priamo súvisí s koncentráciou ATP a meria sa pomocou luminometra. Skúška luciferínu – luciferázy je citlivá metóda kvantifikácie ATP, ktorá sa používa v mnohých rôznych aplikáciách (20).

OPIS SKÚŠKY

Výber druhov zvierat

7. Vybraným druhom pre tento test je myš. Validačné štúdie LLNA: DA sa vykonávali výlučne s myšami kmeňa CBA/J, ktorý sa preto považuje za preferovaný kmeň (12) (13). Použijú sa mladé dospelé negravidné samice myši, ktoré nikdy nevrhli mláďatá. Na začiatku štúdie by zvieratá mali byť vo veku 8 – 12 týždňov a rozdiel medzi hmotnosťami zvierat má byť minimálny a nemá byť vyšší ako 20 % priemernej hmotnosti. Alternatívne sa môžu použiť iné kmene a samce, ak sa na základe údajov dá uspokojivo dokázať, že neexistujú významné odlišnosti špecifické pre kmeň a/alebo pohlavie v odozve na LLNA: DA.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

8. Myši by sa mali umiestniť v skupinách (21), pokiaľ sa neposkytne primerané vedecké odôvodnenie ich umiestnenia jednotlivo. Teplota miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 ± 3 °C. Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 % a pokiaľ možno by nemala prevyšovať 70 % okrem obdobia počas čistenia miestnosti, cieľom je, aby relatívna vlhkosť dosahovala 50 % – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

Príprava zvierat

9. Zvieratá sa vyberú náhodne a sú označené tak, aby sa umožnila jednotlivá identifikácia (ale nie formou ušných značiek), a držia sa v klietkach aspoň 5 dní pred začiatkom podávania dávok, aby sa aklimatizovali na laboratórne podmienky. Pred začatím ošetrenia sa všetky zvieratá vyšetria, aby sa zistilo, že nemajú žiadne viditeľné kožné poranenia.

Príprava dávok

10. Chemikálie v tuhom skupenstve by sa pred podaním dávky do ucha myši mali rozpustiť alebo suspendovať v rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je to vhodné, rozriediť. Kvapalné chemikálie možno podávať priamo alebo pred podaním rozriediť. V prípade nerozpustných chemikálií, ako napríklad tých, ktoré sa vo všeobecnosti používajú ako zdravotnícke pomôcky, by sa pred podaním dávky do ucha myši mala uskutočniť zvýšená extrakcia vo vhodnom rozpúšťadle, aby sa odhalili všetky extrahovateľné zložky, ktoré sa budú testovať. Testované látky sa pripravujú každý deň okrem prípadu, keď údaje o stabilite preukazujú prijateľnosť uskladnenia.

▼M3

Kontrola spoľahlivosti

11. Riadne vykonanie skúšky sa dokazuje pomocou chemikálií na pozitívne kontroly (PC), ktoré reagujú primeranou a reprodukovateľnou citlivosťou na senzibilizujúcu testovanú látku, pre ktorú je dobre charakterizovaná šírka odozvy. Odporúča sa zahrnúť súbežnú pozitívnu kontrolu, pretože to dokazuje kompetenciu laboratória úspešne vykonať každú skúšku a umožňuje posúdenie vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a porovnateľnosti. Pozitívnu kontrolu v každej štúdii vyžadujú aj niektoré regulačné orgány, a preto by používatelia mali pred vykonaním LLNA: DA konzultovať s príslušnými orgánmi. Rutinné použitie súbežnej pozitívnej kontroly sa podporuje aj preto, aby sa predišlo potrebe ďalšieho testovania na zvieratách, s cieľom splniť také požiadavky, ktoré by mohli vyplynúť z použitia periodickej pozitívnej kontroly (pozri odsek 12). Pozitívna kontrola by mala spôsobiť pozitívnu odozvu na LLNA: DA pri úrovni expozície, pri ktorej sa očakáva nárast stimulačného indexu (SI) > 1,8 v porovnaní s negatívnou kontrolnou skupinou. Dávka chemickej látky na pozitívnu kontrolu by sa mala zvoliť tak, aby nespôsobila nadmerné podráždenie kože ani systémovú toxicitu a aby indukcia bola reprodukovateľná, ale nie nadmerná (napr. SI > 10 by bol nadmerný). Vhodnými chemikáliami na pozitívnu kontrolu sú 25 % 3-fenyl-2-hexylpropanál (číslo CAS 101-86-0) a 25 % eugenol (číslo CAS 97-53-0) v acetóne: olivový olej (4: 1, objemové percentá). Môžu sa vyskytnúť okolnosti, keď sa v riadne zdôvodnených prípadoch môžu použiť iné pozitívne kontroly, ktoré spĺňajú uvedené kritériá.

12. Hoci sa odporúča súbežná pozitívna kontrolná skupina, môžu sa vyskytnúť situácie, keď môže byť vhodné periodické testovanie (t. j. v intervaloch najviac 6 mesiacov) pozitívnych kontrol v prípade tých laboratórií, ktoré vykonávajú LLNA: DA pravidelne (t. j. LLNA: DA vykonávajú v priebehu jedného mesiaca aspoň raz) a ktoré majú zavedenú historickú databázu pozitívnych kontrol, ktorá preukazuje schopnosť laboratória dosahovať reprodukovateľné a presné výsledky s pozitívnymi kontrolami. Primeranú odbornosť s použitím LLNA: DA možno úspešne preukázať dosiahnutím konzistentných pozitívnych výsledkov s pozitívnou kontrolou najmenej v 10 nezávislých testoch uskutočnených v určitom primeranom období (t. j. v období kratšom ako jeden rok).

13. Súbežná pozitívna kontrolná skupina by sa mala zahrnúť vždy, keď dôjde k procedurálnej zmene v súvislosti s LLNA: DA (napr. k zmene vyškoleného personálu, zmene materiálov a/alebo reagentov používaných pri testovacej metóde, zmene nástrojov používaných pri testovacej metóde, zmene zdroja testovaných zvierat), a takéto zmeny je potrebné zaznamenať v laboratórnych správach. Je potrebné zvážiť vplyv týchto zmien na primeranosť predtým zriadenej historickej databázy pri určovaní potreby zriadenia novej historickej databázy na zaznamenávanie konzistentnosti výsledkov pozitívnej kontroly.

14. Výskumní pracovníci by si mali uvedomiť, že rozhodnutie vykonať štúdiu pozitívnych kontrol na periodickom základe namiesto súbežných pozitívnych kontrol môže mať následky na primeranosť a prijateľnosť výsledkov negatívnej štúdie získaných bez súbežnej pozitívnej kontroly počas intervalu medzi každou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly. Ak sa dosiahne napríklad falošný negatívny výsledok v periodickej štúdii pozitívnej kontroly, negatívne výsledky získané s testovanou látkou v intervale medzi poslednou prijateľnou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly a neprijateľnou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly možno spochybniť. Dôsledky týchto výsledkov treba dôkladne zvážiť pri určovaní toho, či vykonať súbežné pozitívne kontroly alebo iba periodické pozitívne kontroly. Treba tiež zvážiť použitie menšieho počtu zvierat v súbežnej pozitívnej kontrolnej skupine, ak je to vedecky odôvodnené a ak laboratórium na základe konkrétnych laboratórnych historických údajov preukáže, že možno použiť menší počet myší (22).

▼M3

15. Aj keď by sa pozitívna kontrola mala testovať v nosiči, o ktorom je známe, že vyvoláva konzistentnú odozvu (napr. acetón: olivový olej v pomere 4: 1, objemové percentá), môžu sa vyskytnúť určité regulačné situácie, v ktorých bude potrebné vykonať aj testovanie v neštandardnom nosiči (klinicky/chemicky zodpovedajúcom roztoku) (23). Ak sa súbežná pozitívna kontrola testuje v odlišnom nosiči ako testovaná látka, potom treba do testu súbežnej pozitívnej kontroly zahrnúť samostatnú kontrolnú skupinu, ktorej sa podáva nosič.

16. V prípadoch hodnotenia látok, ktoré patria do konkrétnej chemickej triedy alebo ktoré zastupujú konkrétny rozsah odoziev, môžu byť tiež užitočné referenčné látky, aby sa preukázalo, že testovacia metóda na zisťovanie potenciálu týchto druhov látok spôsobiť senzibilizáciu kože riadne funguje. Vhodné referenčné látky majú mať tieto vlastnosti:

— štrukturálnu a funkčnú podobnosť s triedou testovanej látky, ktorá je predmetom testovania,

— známe fyzikálno-chemické vlastnosti,

— podporné údaje z LLNA: DA,

— podporné údaje z ďalších zvieracích a/alebo ľudských modelov.

TESTOVACÍ POSTUP

Počet zvierat a veľkosť dávky

17. Na dávkovú skupinu sa používajú aspoň štyri zvieratá, aspoň tri koncentrácie testovanej látky a k tomu súbežná negatívna kontrolná skupina, ktorej sa podáva iba nosič testovanej látky, a pozitívna kontrola (súbežná alebo nedávna, podľa laboratórnych pravidiel s prihliadnutím na odseky 11 – 15). Treba zvážiť testovanie viacerých dávok pozitívnej kontroly, najmä ak sa testuje na prerušovanej báze. So zvieratami v kontrolných skupinách by sa malo zaobchádzať rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami okrem prípadov, keď sa ošetrovanie testovanou látkou nevykonáva.

18. Výber dávky a nosiča by mal byť založený na odporúčaniach uvedených v odkazoch (2) a (24). Následné dávky sa zvyčajne vyberajú z vhodných sérií koncentrácií, napr. 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atď. Výber zo sérií koncentrácií je potrebné primerane vedecky zdôvodniť. Všetky existujúce informácie o toxicite (napr. akútnej toxicite a podráždení kože), ako aj štrukturálne a fyzikálno-chemické informácie o predmetnej testovanej látke (a/alebo štrukturálne príbuzných látkach) by sa mali prípadne posúdiť výberom troch po sebe idúcich koncentrácií tak, aby najvyššia koncentrácia maximalizovala expozíciu, pričom by sa však zabránilo systémovej toxicite a/alebo nadmernému lokálnemu podráždeniu kože (24) (25). Ak tieto informácie nie sú k dispozícii, možno bude potrebné vykonať predbežný skríningový test (pozri odseky 21 – 24).

19. Nosič by nemal ovplyvňovať výsledok testu a mal by sa vybrať na základe maximálnej rozpustnosti s cieľom získať najvyššiu dosiahnuteľnú koncentráciu, pričom vznikne roztok/suspenzia vhodná na aplikáciu testovanej látky. Odporúčané nosiče sú acetón: olivový olej (4: 1, objemové percentá), *N,N*-dimetylformamid, metyletylketón, propylénglykol a dimetylsulfoxid (6), ale môžu sa použiť aj iné nosiče, ak sa uvedie uspokojivé vedecké zdôvodnenie. V určitých situáciách môže byť potrebné použiť ako ďalšiu kontrolu klinicky vhodný roztok alebo komerčný prípravok, v ktorom sa testovaná látka predáva. Osobitnú pozornosť je potrebné venovať zabezpečeniu, aby sa hydrofilné testované látky začlenili do systému nosiča, ktorý zvlhčuje pokožku, a rýchlo neunikli, a to začlenením vhodných rozpúšťadiel (napr. 1 % Pluronic® L92). Preto je potrebné vyhýbať sa použitiu čisto vodných nosičov.

▼M3

20. Spracovanie lymfatických uzlín jednotlivých myší umožňuje posúdiť variabilitu medzi zvieratami a štatisticky porovnať rozdiel medzi meraniami testovanej látky a kontrolnej skupiny, ktorej sa podáva nosič (pozri odsek 33). Okrem toho sa zníženie počtu myší v pozitívnej kontrolnej skupine môže prehodnotiť len po poskytnutí informácií o jednotlivých zvieratách (22). Navyše niektoré regulačné orgány požadujú zber údajov o jednotlivých zvieratách. Pravidelný zber údajov o jednotlivých zvieratách poskytuje výhodu, pokiaľ ide o dobré životné podmienky zvierat, pretože sa predchádza duplicitnému testovaniu, ktoré by bolo potrebné v prípade, ak by výsledky testovanej látky pôvodne získané jedným spôsobom (napr. prostredníctvom spojených údajov o zvieratách) museli neskôr posúdiť regulačné orgány podľa iných požiadaviek (napr. prostredníctvom údajov o jednotlivých zvieratách).

Predbežný skríningový test

21. V prípade, ak nie sú k dispozícii informácie na stanovenie najvyššej dávky testovanej látky (pozri odsek 18), treba vykonať predbežný skríningový test s cieľom stanoviť primeranú úroveň testovanej dávky na použitie v LLNA: DA. Cieľom predbežného skríningového testu je poskytnúť usmernenie na výber maximálnej úrovne dávky na použitie v hlavnej štúdii LLNA: DA v prípade, že nie sú dostupné informácie o koncentrácii, ktorá spôsobuje systémovú toxicitu (pozri odsek 24) a/alebo nadmerné lokálne podráždenie kože (pozri odsek 23). Maximálna úroveň testovanej dávky by mala obsahovať 100 % testovanej látky v prípade kvapalín alebo maximálnu možnú koncentráciu v prípade tuhých látok alebo suspenzií.

22. Predbežný skríningový test sa vykonáva za podmienok, ktoré sú identické s hlavnou štúdiou LLNA: DA s tým rozdielom, že sa neposudzuje proliferácia lymfatickej uzliny a môže sa použiť menší počet zvierat na dávkovú skupinu. Navrhuje sa jedno alebo dve zvieratá na dávkovú skupinu. U všetkých myší sa každý deň pozorujú klinické príznaky systémovej toxicity alebo lokálneho podráždenia v mieste aplikácie. Telesné hmotnosti zvierat sa zaznamenajú na začiatku testu a pred usmrtením (deň 8). Obidve uši každej myši sa vyšetria, či nemajú príznaky erytému (sčervenania kože), a vyhodnotia sa podľa tabuľky 1 (25). Hrúbka ucha sa odmeria pomocou meradla hrúbky (napr. digitálnym mikrometrom alebo meradlom hrúbky Peacock Dial) v deň 1 (pred aplikáciou dávky), v deň 3 (približne 48 hodín po prvej dávke), v deň 7 (24 hodín pred usmrtením) a v deň 8. Okrem toho možno hrúbku ucha v deň 8 určiť na základe meraní vážením vzoriek uší, ktoré by sa malo vykonať po humánnom usmrtení zvierat. Nadmerné lokálne podráždenie kože indikuje hodnotenie erytému ≥ 3 a/alebo zvýšenie hrúbky ucha o ≥ 25 % v ktorýkoľvek deň merania (26) (27). Najvyššia dávka vybraná pre hlavnú štúdiu LLNA: DA bude najbližšia nižšia dávka z predbežných skríningových sérií koncentrácií (pozri odsek 18), ktorá nespôsobuje systémovú toxicitu a/ani nadmerné lokálne podráždenie kože.

Tabuľka 1

Hodnotenia erytému

Pozorovanie	Hodnotenie
Žiadny erytém	0
Veľmi slabý erytém (sotva pozorovateľný)	1
Jasne ohraničený erytém	2

▼M3

Pozorovanie	Hodnotenie
Mierny až silný erytém	3
Výrazný erytém (tmavočervený) až vytvorenie chrasty zabraňujúcej posúdeniu erytému	4

23. Okrem 25 % zvýšenia hrúbky ucha (26) (27) sa štatisticky významné zvýšenie hrúbky ucha v testovanej skupine myší v porovnaní s kontrolnou skupinou myší použilo aj na identifikáciu dráždivých látok v LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Štatisticky významné zvýšenie hrúbky ucha môže nastať aj vtedy, keď dôjde k zvýšeniu menšiemu ako 25 %, nespája sa však konkrétne s nadmerným podráždením kože (30) (31) (32) (33) (34).

24. Nasledujúce klinické pozorovania môžu indikovať systémovú toxicitu (35), ak sú súčasťou integrovaného posudzovania, to znamená, že môžu indikovať maximálnu úroveň dávky na použitie v hlavnej štúdii LLNA: DA: zmeny funkcie nervového systému (napr. piloerekcia, ataxia, triaška a kŕče); zmeny správania (napr. agresia, zmena pri čistení, výrazná zmena stupňa aktivity); zmena dýchania (t. j. zmena frekvencie alebo intenzity dýchania, ako napríklad zadúšanie, dýchavičnosť a šelest) a zmeny spotreby potravy a vody. Okrem toho treba v hodnotení zvážiť príznaky letargie a/alebo apatie a akékoľvek klinické príznaky silnejšej alebo dlhodobejšej bolesti a utrpenia alebo viac ako 5 % zníženie telesnej hmotnosti medzi dňom 1 a 8 a úmrtnosť. Umierajúce zvieratá alebo zvieratá, ktoré majú zjavne silné bolesti alebo vykazujú príznaky silného utrpenia, by sa mali humánnym spôsobom usmrtiť (36).

Harmonogram pokusov v hlavnej štúdii

25. Harmonogram pokusov v rámci skúšky je takýto:

— Deň 1: Označte každé zviera a zaznamenajte jeho hmotnosť a akékoľvek klinické pozorovania. Aplikujte 1 % vodný roztok laurylsulfátu sodného (SLS) na zadnú stranu každého ucha štyrmi až piatimi ťahmi kefky namočenej v roztoku SLS tak, aby bola pokrytá celá zadná strana každého ucha. Hodinu po aplikácii SLS začnite s aplikáciou 25 µL z príslušného zriedenia testovanej látky, samotného nosiča alebo pozitívnej kontroly (súbežnej alebo nedávnej, podľa laboratórnych pravidiel s prihliadnutím na odseky 11 – 15) na zadnú stranu každého ucha.

— Dni 2, 3 a 7: Zopakujte predbežné ošetrenie 1 % vodným roztokom SLS a postup aplikácie testovanej látky vykonaný v prvom dni.

— Dni 4, 5 a 6: Žiadne ošetrenie.

— Deň 8: Zaznamenajte hmotnosť každého zvieraťa a akékoľvek klinické príznaky. Približne 24 až 30 hodín po začatí aplikácie v deň 7 sa zvieratá humánne usmrtia. Drénované ušné lymfatické uzliny sa odstránia z každého ucha myši a jednotlivo sa spracujú vo fosfátom tlmenom fyziologickom roztoku (PBS) pre každé zviera. Údaje a diagramy identifikácie a disekcie lymfatických uzlín možno nájsť v odkaze (22). Pri ďalšom monitorovaní lokálnej odozvy kože v hlavnej štúdii možno do protokolu štúdie zahrnúť ďalšie parametre, ako napríklad hodnotenie erytému ucha alebo merania hrúbky ucha (získané pomocou meradla hrúbky alebo vážením vzoriek uší pri pitve).

▼M3

Príprava bunkových suspenzií

26. Jednobunková suspenzia buniek lymfatických uzlín (LNC) odobraná bilaterálne z každej myši sa pripravuje tak, že lymfatické uzliny sa uložia medzi dve podložné sklíčka, ktoré sa mierne stlačia, aby sa uzliny rozdrvili. Presvedčte sa, že tkanivo je rovnomerne rozložené, a potom podložné sklíčka oddeľte. Rozpustite tkanivo na oboch sklíčkach vo fosfátom tlmenom fyziologickom roztoku; každé sklíčko držte v určitom uhle nad Petriho miskou a opláchnite roztokom PBS, pričom súbežne škrabkou na bunky odoberte tkanivo zo sklíčka. Navyše keďže lymfatické uzliny zvierat v negatívnej kontrole sú malé, dôležité je opatrné zaobchádzanie, aby sa predišlo umelým účinkom na hodnoty SI. Na opláchnutie obidvoch sklíčok by sa mal použiť celkový objem 1 ml roztoku PBS. Suspenzia buniek lymfatických uzlín v Petriho miske by sa mala mierne homogenizovať škrabkou na bunky. Následne sa zo suspenzie buniek lymfatických uzlín mikropipetou odoberie alikvotná časť 20 µl, pričom sa dbá na to, aby sa neodobrala okom viditeľná membrána, a táto alikvotná časť sa zmieša s 1,98 ml roztoku PBS tak, aby sa získali 2 ml vzorky. Druhá 2 ml vzorka sa potom pripraví rovnakým postupom, takže pre každé zviera sa pripravia dve vzorky.

Stanovenie proliferácie buniek (meranie obsahu ATP v lymfocytoch)

27. Zvýšenie obsahu ATP v lymfatických uzlinách sa meria metódou, ktorá využíva luciferín/luciferázu a súpravu na meranie ATP, ktorá meria bioluminiscenciu v jednotkách relatívnej luminiscencie (RLU). Čas skúšky od času usmrtenia zvieraťa po meranie obsahu ATP má byť jednotný u každého zvieraťa a má trvať približne 30 minút, pretože obsah ATP sa zrejme po usmrtení zvieraťa postupne znižuje (12). Preto by sa séria postupov od odobrania ušných lymfatických uzlín až po meranie ATP mala dokončiť do 20 minút podľa vopred určeného časového plánu, ktorý je rovnaký pre každé zviera. Luminiscencia ATP by sa mala merať v každej 2 ml vzorke tak, aby sa získali dva výsledky meraní ATP pre každé zviera. Následne sa určí priemerná luminiscencia ATP, ktorá sa použije v ďalších výpočtoch (pozri odsek 30).

POZOROVANIA

Klinické pozorovania

28. Každá myš sa starostlivo vyšetrí aspoň jedenkrát denne na všetky klinické príznaky, či už ide o lokálne podráždenie v mieste aplikácie, alebo o systémovú toxicitu. Všetky pozorovania sa systematicky zaznamenávajú, pričom každá myš má individuálny záznam. Plány na monitorovanie by mali zahŕňať kritériá na rýchlu identifikáciu tých myší, ktoré vykazujú systémovú toxicitu, nadmerné lokálne podráždenie alebo poleptanie kože a ktoré majú byť humánne usmrtené (36).

Telesné hmotnosti

29. Ako sa uvádza v odseku 25, telesné hmotnosti jednotlivých zvierat by sa mali odmerať na začiatku testu a pri naplánovanom usmrtení zvierat.

VÝPOČET VÝSLEDKOV

30. Výsledky v každej pokusnej skupine sa vyjadrujú ako priemerná hodnota stimulačného indexu (SI). SI sa získa vydelením priemernej hodnoty RLU/myš v rámci každej skupiny, ktorej sa podávala testovaná látka, a pozitívnej kontrolnej skupiny priemernou hodnotou RLU/myš v kontrolnej skupine, ktorej sa podávalo rozpúšťadlo/nosič. Priemerná hodnota SI kontrolných skupín, ktorým sa podával nosič, je potom 1.

▼M3

31. V rozhodovacom procese sa za pozitívny výsledok považuje stimulačný index ≥ 1,8 (10). Pri určovaní toho, či hraničný výsledok (t. j. hodnota SI v rozmedzí od 1,8 do 2,5) je pozitívny, sa však môže použiť aj sila vzťahu medzi dávkou a odozvou, štatistický význam a konzistentnosť rozpúšťadla/nosiča a odoziev pozitívnej kontroly (2) (3) (37).

32. Pri hraničnej pozitívnej odozve, keď sa SI pohybuje medzi 1,8 a 2,5, môžu používatelia na potvrdenie toho, že takéto výsledky sú pozitívne, zvážiť doplňujúce informácie, ako napríklad vzťah medzi dávkou a odozvou, dôkazy systémovej toxicity alebo nadmerného podráždenia a v prípade potreby štatistický význam spolu s hodnotami SI (10). Pozornosť by sa mala venovať aj rôznym vlastnostiam testovanej látky vrátane toho, či má štrukturálny vzťah k látkam, ktoré sú známymi senzibilizátormi kože, či spôsobuje nadmerné podráždenie kože myši, a vrátane charakteru pozorovanej odozvy na dávku. Tieto a ostatné hľadiská sa podrobne rozoberajú inde (4).

33. Zber údajov na úrovni jednotlivých myší umožní vykonať štatistickú analýzu prítomnosti a úrovne vzťahu medzi dávkou a odozvou v údajoch. Každé štatistické posúdenie by mohlo zahŕňať hodnotenie vzťahu medzi dávkou a odozvou, ako aj vhodne upravené porovnávania testovaných skupín (napr. porovnávania v pároch skupiny, ktorej sa podáva dávka, a súbežnej kontrolnej skupiny s rozpúšťadlom/nosičom). Štatistické analýzy môžu zahŕňať napr. lineárnu regresiu alebo Williamsov test na posúdenie trendov vo vzťahu medzi dávkou a odozvou a Dunnettov test na porovnávanie v pároch. Pri výbere vhodnej metódy štatistickej analýzy by si výskumný pracovník mal uvedomovať možné nerovnosti rozdielov a ďalšie súvisiace problémy, ktoré si môžu vyžadovať premenu údajov alebo štatistickú analýzu založenú na iných ako parametrických údajoch. Výskumný pracovník bude možno v každom prípade musieť vykonať výpočty SI a štatistické analýzy s určitými dátovými bodmi a bez nich (niekedy sa tieto údaje nazývajú „extrémne hodnoty“).

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

34. Údaje by sa mali zhrnúť vo forme tabuľky, v ktorej sa uvádzajú hodnoty RLU jednotlivých zvierat, skupinová priemerná hodnota RLU/zviera, súvisiaci rozsah chyby (napr. SD, SEM) a stredná hodnota SI pre každú dávkovú skupinu v porovnaní so súbežnou kontrolnou skupinou s rozpúšťadlom/nosičom.

Správa o teste

35. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testované a kontrolné chemické látky:

— identifikačné údaje (napr. čísla CAS, čísla EC, ak sú k dispozícii, zdroj, čistota, známe nečistoty, číslo šarže),

— fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti (napr. prchavosť, stabilita, rozpustnosť),

— v prípade zmesi zloženie a relatívny percentuálny podiel zložiek.

Rozpúšťadlo/nosič:

— identifikačné údaje (čistota, v prípade potreby koncentrácia, použitý objem),

— zdôvodnenie voľby nosiča.

▼M3

Testovacie zvieratá:

— použitý kmeň myší CBA,

— mikrobiologický stav zvierat, ak je známy,

— počet a vek zvierat,

— zdroj zvierat, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

Podmienky testu:

— zdroj, číslo šarže a kontrolné údaje výrobcu o kvalite/presnosti súpravy ATP,

— informácie o príprave a aplikácii testovanej látky,

— zdôvodnenie výberu dávky (vrátane výsledkov z predbežného skríningového testu, ak sa uskutočnil),

— použité koncentrácie nosiča a testovanej látky a celkové množstvo aplikovanej testovanej látky,

— údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu/zdroja krmiva, zdroja vody),

— podrobný opis harmonogramu podávania dávok a odberu vzoriek,

— metódy merania toxicity,

— kritériá na hodnotenie štúdií ako pozitívnych alebo negatívnych,

— informácie o akýchkoľvek odchýlkach od protokolu a vysvetlenie, ako odchýlky ovplyvňujú návrh a výsledky štúdie.

Kontrola spoľahlivosti:

— súhrn výsledkov poslednej kontroly spoľahlivosti vrátane informácií o testovanej látke, koncentrácii a použitom nosiči,

— súbežné a/alebo historické kontrolné údaje o pozitívnej a súbežnej negatívnej kontrole (s rozpúšťadlom/nosičom) pre testovacie laboratórium,

— ak nebola zahrnutá súbežná pozitívna kontrola, dátum a laboratórna správa o najaktuálnejšej periodickej pozitívnej kontrole a správa s historickými údajmi o pozitívnej kontrole, ktorými laboratórium zdôvodňuje nevykonanie súbežnej pozitívnej kontroly.

Výsledky:

— hmotnosti jednotlivých myší na začiatku podávania dávky a pri naplánovanom usmrtení, ako aj priemerný a súvisiaci rozsah chyby (napr. SD a SEM) pre každú pokusnú skupinu,

— časový priebeh nástupu príznakov toxicity u každého zvieraťa vrátane podráždenia kože v mieste podania látky, ak sa vyskytnú,

— čas usmrtenia zvieraťa a čas merania ATP u každého zvieraťa,

— tabuľka hodnôt RLU jednotlivých myší a hodnoty SI každej pokusnej skupiny s dávkou,

— priemerný a súvisiaci rozsah chyby (napr. SD, SEM) v súvislosti s hodnotami RLU/myš každej pokusnej skupiny a výsledky analýzy extrémnej hodnoty v každej pokusnej skupine,

▼M3

— výpočet SI a vhodné opatrenie variability, ktoré berie do úvahy variabilitu medzi zvieratami v skupinách, ktorým sa podáva testovaná látka, a v kontrolných skupinách,

— vzťah medzi dávkou a odozvou,

— v prípade potreby štatistické analýzy.

Rozbor výsledkov:

— stručný komentár v súvislosti s výsledkami, analýza odozvy na dávku, štatistické analýzy, ak existujú, s uvedením záveru, či by sa testovaná látka mala považovať za látku spôsobujúcu senzibilizáciu kože.

LITERATÚRA

1. Chamberlain, M. and Basketter, D. A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 999 – 1002.

2. OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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. Healt.*, 53 563 – 579.

38. OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessmen.*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼**M3**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: Miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o opatrenie výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často zamieňa s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (38).

Referenčná látka: Látka spôsobujúca alebo nespôsobujúca senzibilizáciu, ktorá sa používa ako štandardná látka na porovnávanie s testovanou látkou. Referenčná látka by mala mať tieto vlastnosti: i) konzistentný(-é) a spoľahlivý(-é) zdroj(-e); ii) štrukturálnu a funkčnú podobnosť s triedou látok, ktoré sa budú testovať; iii) známe fyzikálno-chemické vlastnosti; iv) podporné údaje o známych účinkoch a v) známu potenciu v rozsahu želanej odozvy.

Falošný negatívny výsledok: Látka je testovanou metódou nesprávne identifikovaná ako negatívna alebo neaktívna, pričom v skutočnosti je pozitívna alebo aktívna.

Falošný pozitívny výsledok: Látka je testom nesprávne identifikovaná ako pozitívna alebo aktívna, pričom v skutočnosti je negatívna alebo neaktívna.

Nebezpečnosť: Potenciál škodlivého účinku na zdravie alebo životné prostredie. Škodlivý účinok sa prejavuje až pri dostatočnej hladine expozície.

Medzilaboratórna reprodukovateľnosť: Miera, do akej rôzne kvalifikované laboratóriá, ktoré používajú rovnaký protokol a testujú rovnaké testovacie látky, dokážu dosiahnuť kvalitatívne a kvantitatívne podobné výsledky. Medzilaboratórna reprodukovateľnosť sa určuje počas postupov pred validáciou a v rámci postupov validácie a znamená mieru, do akej možno test úspešne prenášať medzi laboratóriami. Takisto je známa ako reprodukovateľnosť medzi laboratóriami (38).

Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť: Určenie miery, do akej kvalifikovaní pracovníci v rámci jedného laboratória dokážu úspešne opakovať výsledky s použitím konkrétneho protokolu v rôznom čase. Takisto je známa ako reprodukovateľnosť v rámci laboratória (38).

Extrémna hodnota: Extrémna hodnota je pozorovanie, ktoré je značne odlišné od ostatných hodnôt v náhodnej vzorke z populácie.

Zabezpečovanie kvality: Riadiaci proces, v ktorom jednotlivci nezávislí od osôb vykonávajúcich testy posudzujú súlad s laboratórnymi testovacími normami, požiadavkami a postupmi vedenia záznamov, ako aj presnosť prenosu údajov.

Spoľahlivosť: Meria rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia opakovane vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti (38).

Senzibilizácia kože: Imunologický proces, ku ktorému dochádza po lokálnom vystavení náchylného jednotlivca chemickému alergénu, ktorý vyvoláva kožnú imunitnú reakciu, ktorá môže viesť k vytvoreniu kontaktnej senzibilizácie.

Stimulačný index (SI): Hodnota vypočítaná na posúdenie potenciálu testovanej látky spôsobiť senzibilizáciu kože; ide teda o pomer proliferácie v pokusných skupinách a proliferácie v súbežných kontrolných skupinách, ktorým sa podáva nosič.

Testovaná látka (tiež sa nazýva testovaná chemikália): Akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M3

B. 51. **SENZIBILIZÁCIA KOŽE: LOKÁLNA SKÚŠKA LYMFATICKÝCH UZLÍN: BRDU-ELISA**

ÚVOD

1. Usmernenia Organizácie pre hospodársku spoluprácu a rozvoj (OECD) na testovanie chemikálií a testovacie metódy EÚ sa pravidelne revidujú vzhľadom na vedecký pokrok, zmeny regulačných potrieb a dobré životné podmienky zvierat. Prvá testovacia metóda (TM) (B.42) na stanovenie senzibilizácie kože u myší, tzv. lokálna skúška lymfatických uzlín (LLNA; usmernenie OECD na vykonávanie testov 429) bola zrevidovaná (1 a kapitola B.42 v tejto prílohe). Podrobnosti validácie LLNA a revízia prác v tejto oblasti boli uverejnené (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Pri LLNA sa na meranie proliferácie lymfocytov používa rádioizotopický tymidín alebo jód, a preto má táto skúška obmedzené použitie v tých prípadoch, kde je problematické získavanie, použitie alebo likvidácia rádioaktívnych látok. LLNA: BrdU-ELISA [enzýmová imunoskúška] je nerádioaktívna modifikácia testovacej metódy LLNA, ktorá na meranie proliferácie lymfocytov využíva 5-bróm-2-deoxyuridín (BrdU) (číslo CAS 59-14-3) v systéme testovania založenom na ELISA. LLNA: BrdU-ELISA bola validovaná a zrevidovaná a odporúča ju medzinárodný nezávislý vedecký panel pre partnerské preskúmanie ako užitočnú metódu na identifikáciu chemikálií spôsobujúcich alebo nespôsobujúcich senzibilizáciu kože s určitými obmedzeniami (10) (11) (12). Táto testovacia metóda je vytvorená na posúdenie potenciálu chemikálií (látok a zmesí) spôsobiť senzibilizáciu kože u zvierat. Metóda opísaná v kapitole B.6 tejto prílohy a usmernení OECD na vykonávanie testov 406 využíva testy s morčatami, a to maximalizačný test morčiat a Buehlerov test (13). LLNA (kapitola B.42 tejto prílohy; usmernenie OECD na vykonávanie testov 429) a dve nerádioaktívne modifikácie LLNA: BrdU-ELISA (kapitola B.51 tejto prílohy; usmernenie OECD na vykonávanie testov 442 B) a LLNA: DA (kapitola B.50 tejto prílohy; usmernenie OECD na vykonávanie testov 442 A) poskytujú výhodu v porovnaní s testami na morčatách opísanými v kapitole B.6 a usmernení OECD na vykonávanie testov 406 (13), a to pokiaľ ide o obmedzenie a zdokonalenie využívania zvierat.

2. Podobne ako LLNA, LNNA: BrdU-ELISA skúma indukčnú fázu senzibilizácie kože a poskytuje kvantitatívne údaje vhodné na posúdenie odozvy na dávku. Okrem toho schopnosť identifikovať látky spôsobujúce senzibilizáciu kože bez potreby používania rádioaktívneho značenia DNA znižuje potenciál expozície rádioaktivite pri práci a problémy v súvislosti s likvidáciou odpadu. To môže následne umožniť zvýšené využívanie myší na identifikáciu látok spôsobujúcich senzibilizáciu kože, čo by ďalej mohlo znížiť využívanie morčiat na testovanie potenciálu senzibilizácie kože (t. j. B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13).

VYMEDZENIE POJMOV

3. Použité definície sú uvedené v dodatku 1.

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

4. LLNA: BrdU-ELISA je upravená metóda LLNA na identifikáciu potenciálu chemikálií spôsobiť senzibilizáciu kože, ktorá má určité obmedzenia. Neznamená to nevyhnutne, že vo všetkých prípadoch sa má použiť LLNA: BrdU-ELISA namiesto testu LLNA alebo testov s morčatami (t. j. metóda B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13), ale skôr to, že táto skúška je rovnako hodnotná a môže sa použiť ako alternatíva, v ktorej pozitívne a negatívne výsledky vo všeobecnosti nevyžadujú ďalšie potvrdenie. Testovacie laboratórium by malo posúdiť všetky dostupné informácie o testovanej látke pred uskutočnením štúdie. Takéto informácie

▼M3

budú obsahovať identitu a chemickú štruktúru testovanej látky, jej fyzikálno-chemické vlastnosti, výsledky všetkých ostatných *in vitro* alebo *in vivo* testov toxicity s testovanou látkou a toxikologické údaje o štruktúrne príbuzných chemikáliách. Tieto informácie treba vziať do úvahy pri určovaní, či LLNA: BrdU-ELISA je pre testovanú látku vhodná [vzhľadom na nezlučiteľnosť obmedzených druhov chemikálií s LLNA: BrdU-ELISA (pozri odsek 5)] a ako pomoc pri výbere dávok.

5. LLNA: BrdU-ELISA je metóda *in vivo*, a to znamená, že pri posudzovaní aktivity alergickej kontaktnej senzibilizácie sa nevylučuje používanie zvierat. Má však potenciál obmedziť používanie zvierat na tento účel pri porovnaní s testami na morčatách (B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13). Okrem toho LLNA: BrdU-ELISA ponúka značné zjemnenie spôsobu, akým sa zvieratá používajú na testy alergickej kontaktnej senzibilizácie, keďže na rozdiel od metódy B.6 a usmernenia OECD na vykonávanie testov 406 LLNA: BrdU-ELISA nevyžaduje, aby sa vyvolali reakcie dermálnej hypersenzitivity. Okrem toho LLNA: BrdU-ELISA nevyžaduje použitie adjuvansu ako v prípade maximalizačného testu morčiat (kapitola B.6 tejto prílohy, 13). Testovacia metóda LLNA: BrdU-ELISA tak znižuje utrpenie zvierat. Napriek výhodám, ktoré LLNA: BrdU-ELISA má v porovnaní s metódou B.6 a usmernením OECD na vykonávanie testov 406 (13), existujú určité obmedzenia, pre ktoré možno bude potrebné používať B.6 alebo usmernenie OECD na vykonávanie testov 406 [napr. testovanie určitých kovov, falošné pozitívne zistenia s určitými kožnými dráždivými látkami (ako napríklad niektoré povrchovo aktívne látky) (6) (1 a kapitola B.42 tejto prílohy) alebo rozpustnosť testovanej látky]. Okrem toho chemické triedy alebo látky, ktoré obsahujú potenciálne zmätočné funkčné skupiny (15), si tiež môžu vyžadovať použitie testov s morčatami (t. j. B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13). Obmedzenia, ktoré boli identifikované pre LLNA (1 a kapitola B.42 tejto prílohy), sa odporúčajú aj pre LLNA: BrdU-ELISA (10). Okrem takto identifikovaných obmedzení by sa LLNA: BrdU-ELISA mala uplatňovať pri testovaní akýchkoľvek chemikálií okrem prípadu, keď tieto chemikálie majú vlastnosti, ktoré by mohli narúšať presnosť LLNA: BrdU-ELISA. Okrem toho by sa mala zvážiť možnosť hraničných pozitívnych výsledkov v prípade, že sa dosiahnu hodnoty stimulačného indexu (SI) od 1,6 do 1,9 (pozri odseky 31 a 32). To je založené na validačnej databáze 43 látok s použitím SI ≥ 1,6 (pozri odsek 6), pre ktoré LLNA: BrdU-ELISA správne identifikovala všetkých 32 látok spôsobujúcich senzibilizáciu podľa LLNA, ale nesprávne identifikovala dve z 11 látok nespôsobujúcich senzibilizáciu podľa LLNA s hodnotami SI od 1,6 do 1,9 (t. j. hraničný pozitívny výsledok) (10). Keďže sa však na stanovenie hodnôt SI a výpočet predpokladaných vlastností testu použil rovnaký súbor údajov, stanovené údaje môžu byť nadhodnotením skutočných prediktívnych vlastností.

PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

6. Základným princípom, na ktorom sa LLNA: BrdU-ELISA zakladá, je, že senzibilizátory vyvolávajú proliferáciu lymfocytov v lymfatickej uzline v drénovanom mieste aplikácie testovanej látky. Táto proliferácia je úmerná dávke a účinnosti aplikovaného alergénu a poskytuje jednoduchý prostriedok na získanie kvantitatívneho merania senzibilizácie. Proliferácia sa meria porovnávaním priemernej proliferácie v každej pokusnej skupine s priemernou proliferáciou v kontrolnej skupine, ktorej sa podáva nosič. Určí sa pomer priemernej proliferácie v každej ošetrenej skupine a priemernej proliferácie v súbežnej kontrolnej skupine s nosičom, ktorý sa označuje ako stimulačný index (SI), a mal by mať hodnotu ≥ 1,6 pred ďalším prípadným vyhodnotením testovanej látky ako potenciálneho senzibilizátora kože. Uvedené metódy sú založené na meraní obsahu BrdU na

▼M3

preukázanie proliferácie zvýšeného počtu buniek v drénovaných ušných lymfatických uzlinách. BrdU je podobný tymidínu a je podobne začlenený do DNA proliferujúcich buniek. Začlenenie BrdU sa meria metódou ELISA, ktorá využíva peroxidázou označenú protilátku špecifickú pre BrdU. Peroxidáza po pridaní substrátu reaguje so substrátom produkujúcim sfarbený produkt, ktorý sa kvantifikuje pri konkrétnej absorbancii na mikrotitračnej platničke.

OPIS SKÚŠKY

Výber druhov zvierat

7. Vybraným druhom pre tento test je myš. Validačné štúdie LLNA: BrdU-ELISA sa vykonávali výlučne s myšami kmeňa CBA/JN, ktorý sa preto považuje za preferovaný kmeň (10) (12). Použijú sa mladé dospelé negravidné samice myši, ktoré nikdy nevrhli mláďatá. Na začiatku štúdie by zvieratá mali byť vo veku 8 – 12 týždňov a rozdiel medzi hmotnosťami zvierat má byť minimálny a nemá byť vyšší ako 20 % priemernej hmotnosti. Alternatívne sa môžu použiť iné kmene a samce, ak sa na základe údajov dá uspokojivo dokázať, že neexistujú významné odlišnosti špecifické pre kmeň a/alebo pohlavie v odozve na LLNA: BrdU-ELISA.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

8. Myši by sa mali umiestniť v skupinách (16) okrem prípadu, ak sa poskytne primerané vedecké odôvodnenie ich umiestnenia jednotlivo. Teplota miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 ± 3 °C. Aj keď by relatívna vlhkosť mala byť aspoň 30 % a pokiaľ možno by nemala prevyšovať 70 % okrem obdobia počas čistenia miestnosti, cieľom je, aby relatívna vlhkosť dosahovala 50 % – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

Príprava zvierat

9. Zvieratá sa vyberú náhodne a sú označené tak, aby sa umožnila jednotlivá identifikácia (ale nie formou ušných značiek), a držia sa v klietkach aspoň 5 dní pred začiatkom podávania dávok, aby sa aklimatizovali na laboratórne podmienky. Pred začatím ošetrenia sa všetky zvieratá vyšetria, aby sa zistilo, že nemajú žiadne viditeľné kožné poranenia.

Príprava dávok

10. Chemikálie v tuhom skupenstve by sa pred podaním dávky do ucha myši mali rozpustiť alebo suspendovať v rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je to vhodné, rozriediť. Kvapalné chemikálie možno podávať priamo alebo pred podaním rozriediť. V prípade nerozpustných chemikálií, ako napríklad tých, ktoré sa vo všeobecnosti používajú ako zdravotnícke pomôcky, by sa pred podaním dávky do ucha myši mala uskutočniť zvýšená extrakcia vo vhodnom rozpúšťadle, aby sa odhalili všetky extrahovateľné zložky, ktoré sa budú testovať. Testované látky sa pripravujú každý deň okrem prípadu, keď údaje o stabilite preukazujú prijateľnosť uskladnenia.

Kontrola spoľahlivosti

11. Riadne vykonanie skúšky sa dokazuje pomocou pozitívnych kontrolných chemikálií, ktoré reagujú primeranou a reprodukovateľnou citlivosťou ako senzibilizujúce testované látky, pre ktoré je dobre charakterizovaná šírka odozvy. Odporúča sa zahrnúť súbežnú pozitívnu kontrolu, pretože to dokazuje kompetenciu laboratória úspešne vykonať každú skúšku a umožňuje posúdenie vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a porovnateľnosti. Pozitívnu kontrolu v každej štúdii vyžadujú aj niektoré

▼M3

regulačné orgány, a preto by používatelia mali pred vykonaním LLNA: BrdU-ELISA konzultovať s príslušnými orgánmi. Rutinné použitie súbežnej pozitívnej kontroly sa podporuje aj preto, aby sa predišlo potrebe ďalšieho testovania na zvieratách s cieľom splniť také požiadavky, ktoré by mohli vzniknúť z použitia periodickej pozitívnej kontroly (pozri odsek 12). Pozitívna kontrola by mala spôsobiť pozitívnu odozvu na LLNA: BrdU-ELISA pri úrovni expozície, pri ktorej sa očakáva nárast stimulačného indexu (SI) > 1,6 v porovnaní s negatívnou kontrolnou (NC) skupinou. Dávka chemickej látky na pozitívnu kontrolu by sa mala zvoliť tak, aby nespôsobila nadmerné podráždenie kože ani systémovú toxicitu a aby indukcia bola reprodukovateľná, ale nie nadmerná (napr. SI > 14 by bol nadmerný). Vhodnými chemikáliami na pozitívnu kontrolu sú: 25 % 3-fenyl-2-hexylpropanál (číslo CAS 101-86-0) a 25 % eugenol (číslo CAS 97-53-0) v acetóne: olivový olej (4: 1, objemové percentá). Môžu sa vyskytnúť okolnosti, keď sa v riadne zdôvodnených prípadoch môžu použiť iné pozitívne kontroly, ktoré spĺňajú uvedené kritériá.

12. Hoci sa odporúča zahrnutie súbežnej pozitívnej kontrolnej skupiny, môžu sa vyskytnúť situácie, keď periodické testovanie (v intervaloch ≤ 6 mesiacov) s pozitívnou kontrolou môže byť vhodné v prípade tých laboratórií, ktoré vykonávajú LLNA: BrdU-ELISA pravidelne (t. j. vykonávajú LLNA: BrdU-ELISA v priebehu jedného mesiaca aspoň raz) a ktoré majú zavedenú historickú databázu pozitívnych kontrol, ktorá preukazuje schopnosť laboratória dosahovať reprodukovateľné a presné výsledky v pozitívnych kontrolách. BrdU-ELISA možno úspešne preukázať dosiahnutím konzistentných pozitívnych výsledkov v pozitívnej kontrole najmenej v 10 nezávislých testoch uskutočnených v určitom primeranom období (t. j. v období kratšom ako jeden rok).

13. Súbežná pozitívna kontrolná skupina sa má zahrnúť vždy, keď dôjde k procedurálnej zmene v súvislosti s LLNA: BrdU-ELISA (napr. k zmene vyškoleného personálu, zmene materiálov a/alebo reagentov používaných pri testovacej metóde, zmene nástrojov používaných pri testovacej metóde alebo zmene zdroja testovaných zvierat), a takéto zmeny je potrebné zaznamenať v laboratórnych správach. Je potrebné zvážiť vplyv týchto zmien na primeranosť predtým zriadenej historickej databázy pri určovaní potreby zriadenia novej historickej databázy na zaznamenávanie konzistentnosti výsledkov pozitívnej kontroly.

14. Výskumní pracovníci by si mali uvedomiť, že rozhodnutie vykonať štúdiu pozitívnych kontrol na periodickom základe namiesto súbežných pozitívnych kontrol môže mať následky na primeranosť a prijateľnosť výsledkov negatívnej štúdie získaných bez súbežnej pozitívnej kontroly počas intervalu medzi každou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly. Ak sa dosiahne napríklad falošný negatívny výsledok v periodickej štúdii pozitívnej kontroly, negatívne výsledky získané s testovanou látkou v intervale medzi poslednou prijateľnou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly a neprijateľnou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly možno spochybniť. Dôsledky týchto výsledkov treba dôkladne zvážiť pri určovaní toho, či vykonať súbežné pozitívne kontroly, alebo iba periodické pozitívne kontroly. Treba tiež zvážiť použitie menšieho počtu zvierat v súbežnej pozitívnej kontrolnej skupine, ak je to vedecky odôvodnené a ak laboratórium na základe konkrétnych laboratórnych historických údajov preukáže, že možno použiť menší počet myší (17).

15. Aj keď by sa pozitívna kontrola mala testovať v nosiči, o ktorom je známe, že vyvoláva konzistentnú odozvu (napr. acetón: olivový olej v pomere 4: 1, objemové percentá), môžu sa vyskytnúť určité regulačné situácie, v ktorých bude potrebné vykonať aj testovanie v neštandardnom nosiči (klinicky/chemicky zodpovedajúcom roztoku) (18). Ak sa súbežná pozitívna kontrola testuje v odlišnom nosiči ako testovaná látka, potom treba do testu súbežnej pozitívnej kontroly zahrnúť samostatnú kontrolnú skupinu, ktorej sa podáva nosič.

▼M3

16. V prípadoch hodnotenia testovaných látok, ktoré patria do konkrétnej chemickej triedy, alebo rozsahu odoziev môžu byť užitočné aj referenčné látky, aby sa preukázalo, že testovacia metóda na zisťovanie potenciálu týchto druhov testovaných látok spôsobiť senzibilizáciu kože funguje riadne. Vhodné referenčné látky majú mať tieto vlastnosti:

— štrukturálnu a funkčnú podobnosť s triedou testovanej látky, ktorá je predmetom testovania,

— známe fyzikálno-chemické vlastnosti,

— podporné údaje z LLNA: BrdU-ELISA,

— podporné údaje z ďalších zvieracích a/alebo ľudských modelov.

TESTOVACÍ POSTUP

Počet zvierat a veľkosť dávky

17. Na dávkovú skupinu sa používajú aspoň štyri zvieratá, aspoň tri koncentrácie testovanej látky a k tomu súbežná negatívna kontrolná skupina, ktorej sa podáva iba nosič pre testovanú látku, a pozitívna kontrolná skupina (súbežná alebo súčasná, podľa laboratórnych pravidiel v súvisiacich odsekoch 11 – 15). Treba zvážiť testovanie viacerých dávok pozitívnej kontroly, najmä ak sa testuje na prerušovanej báze. So zvieratami v kontrolných skupinách by sa malo zaobchádzať rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami okrem prípadov, keď sa ošetrovanie testovanou látkou nevykonáva.

18. Výber dávky a nosiča by mal byť založený na odporúčaniach uvedených v odkazoch 2 a 19. Následné dávky sa zvyčajne vyberajú z vhodných sérií koncentrácií, napr. 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atď. Výber zo sérií koncentrácií je potrebné primerane vedecky zdôvodniť. Všetky existujúce informácie o toxicite (napr. akútna toxicita a podráždenie kože), ako aj štrukturálne a fyzikálno-chemické informácie o testovanej látke, ktorá je predmetom záujmu (a/alebo štrukturálne príbuzných látkach), ak sú k dispozícii, by sa mali posúdiť výberom troch po sebe idúcich koncentrácií tak, aby najvyššia koncentrácia maximalizovala expozíciu, pričom by sa však zabránilo systémovej toxicite a/alebo nadmernému lokálnemu podráždeniu kože (19) (20 a kapitola B.4 tejto prílohy). Ak tieto informácie nie sú k dispozícii, možno bude potrebné vykonať predbežný skríningový test (pozri odseky 21 – 24).

19. Nosič by nemal ovplyvňovať výsledok testu a mal by sa vybrať na základe maximálnej rozpustnosti s cieľom získať najvyššiu dosiahnuteľnú koncentráciu, pričom vznikne roztok/suspenzia vhodná na aplikáciu testovanej látky. Odporúčané nosiče sú: acetón: olivový olej (4: 1, objemové percentá), *N,N*-dimetylformamid, metyletylketón, propylénglykol a dimetylsulfoxid (6), ale môžu sa použiť aj iné, ak sa uvedie uspokojivé vedecké zdôvodnenie. V určitých situáciách môže byť potrebné použiť ako ďalšiu kontrolu klinicky vhodný roztok alebo komerčný prípravok, v ktorom sa testovaná látka predáva. Osobitnú pozornosť je potrebné venovať zabezpečeniu toho, aby sa hydrofilné testované látky začlenili do systému nosiča, ktorý zvlhčuje pokožku, a rýchlo neunikli, a to začlenením vhodných rozpúšťadiel (napr. 1 % Pluronic® L92). Preto je potrebné vyhýbať sa použitiu čisto vodných nosičov.

▼M3

20. Spracovanie lymfatických uzlín jednotlivých myší umožňuje posúdiť variabilitu medzi zvieratami a štatisticky porovnať rozdiel medzi meraniami testovanej látky a kontrolnej skupiny, ktorej sa podáva nosič (pozri odsek 33). Okrem toho sa zníženie počtu myší v pozitívnej kontrolnej skupine môže prehodnotiť len po poskytnutí informácií o jednotlivých zvieratách (17). Navyše niektoré regulačné orgány požadujú zber údajov o jednotlivých zvieratách. Pravidelný zber údajov o jednotlivých zvieratách poskytuje výhodu, pokiaľ ide o dobré životné podmienky zvierat, pretože sa predchádza duplicitnému testovaniu, ktoré by bolo potrebné v prípade, ak by výsledky testovanej látky pôvodne získané jedným spôsobom (napr. prostredníctvom spojených údajov o zvieratách) museli neskôr posúdiť regulačné orgány podľa iných požiadaviek (napr. prostredníctvom údajov o jednotlivých zvieratách).

Predbežný skríningový test

21. V prípade, ak nie sú k dispozícii informácie na stanovenie najvyššej dávky testovanej látky (pozri odsek 18), treba vykonať predbežný skríningový test s cieľom stanoviť primeranú úroveň testovanej dávky na použitie v LLNA: BrdU-ELISA. Cieľom predbežného skríningového testu je poskytnúť usmernenie na výber maximálnej úrovne dávky na použitie v hlavnej štúdii LLNA: BrdU-ELISA v prípade, že nie sú dostupné informácie o koncentrácii, ktorá spôsobuje systémovú toxicitu (pozri odsek 24) a/alebo nadmerné lokálne podráždenie kože (pozri odsek 23). Maximálna úroveň testovanej dávky by mala obsahovať 100 % testovanej látky v prípade kvapalín alebo maximálnu možnú koncentráciu v prípade tuhých látok alebo suspenzií.

22. Predbežný skríningový test sa vykonáva za podmienok, ktoré sú identické s hlavnou štúdiou LLNA: BrdU-ELISA, s tým rozdielom, že sa neposudzuje proliferácia lymfatickej uzliny a môže sa použiť menší počet zvierat na dávkovú skupinu. Navrhuje sa jedno alebo dve zvieratá na dávkovú skupinu. U všetkých myší sa každý deň pozorujú klinické príznaky systémovej toxicity alebo lokálneho podráždenia v mieste aplikácie. Telesné hmotnosti zvierat sa zaznamenajú na začiatku testu a pred usmrtením (deň 6). Obidve uši myší sa vyšetria, či nemajú príznaky erytému (sčervenania kože), a vyhodnotia sa podľa tabuľky 1 (20 a kapitola B.4 tejto prílohy). Hrúbka ucha sa meria pomocou meradla hrúbky (napr. digitálnym mikrometrom alebo meradlom hrúbky Peacock Dial) v deň 1 (pred aplikáciou dávky), v deň 3 (približne 48 hodín po prvej dávke) a v deň 6. Okrem toho možno hrúbku ucha v deň 6 určiť na základe meraní vážením vzoriek uší, ktoré by sa malo vykonať po humánnom usmrtení zvierat. Nadmerné lokálne podráždenie kože indikuje hodnotenie erytému ≥ 3 a/alebo zvýšenie hrúbky ucha o ≥ 25 % v ktorýkoľvek deň merania (21) (22). Najvyššia dávka vybraná pre hlavnú štúdiu LLNA: BrdU-ELISA bude najbližšia nižšia dávka z predbežných skríningových sérií koncentrácií (pozri odsek 18), ktorá nespôsobuje systémovú toxicitu a/ani nadmerné lokálne podráždenie kože.

Tabuľka 1

Hodnotenia erytému

Pozorovanie	Hodnotenie
Žiadny erytém	0
Veľmi slabý erytém (sotva pozorovateľný)	1
Jasne ohraničený erytém	2

▼M3

Pozorovanie	Hodnotenie
Mierny až silný erytém	3
Výrazný erytém (tmavočervený) až vytvorenie chrasty zabraňujúcej posúdeniu erytému	4

23. Okrem 25 % zvýšenia hrúbky ucha (21) (22) sa štatisticky významné zvýšenie hrúbky ucha v testovanej skupine myší v porovnaní s kontrolnou skupinou myší tiež použilo na identifikáciu dráždivých látok v skúške LLNA (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Kým štatisticky významné zvýšenia môžu nastať, aj keď dôjde k zvýšeniu hrúbky ucha menšiemu ako 25 %, nie sú však konkrétne spájané s nadmerným podráždením kože (25) (26) (27) (28) (29).

24. Nasledujúce klinické pozorovania môžu indikovať systémovú toxicitu (30), ak sú súčasťou integrovaného posudzovania, to znamená, že môžu indikovať maximálnu dávku na použitie v hlavnej LLNA: BrdU-ELISA: zmeny funkcie nervového systému (napr. piloerekcia, ataxia, triaška a kŕče), zmeny správania (napr. agresia, zmena pri čistení, výrazná zmena stupňa aktivity), zmena dýchania (t. j. zmena frekvencie alebo intenzity dýchania, ako napríklad zadúšanie, dýchavičnosť a šelest) a zmeny spotreby potravy a vody. Okrem toho treba v hodnotení zvážiť príznaky letargie a/alebo apatie a akékoľvek klinické príznaky silnejšej alebo dlhodobejšej bolesti a utrpenia alebo viac ako 5 % zníženie telesnej hmotnosti medzi dňom 1 a 6 a úmrtnosť. Umierajúce zvieratá alebo zvieratá, ktoré majú zjavne silné bolesti alebo vykazujú príznaky silného utrpenia, by sa mali humánnym spôsobom usmrtiť (31).

Harmonogram pokusov v hlavnej štúdii

25. Harmonogram pokusov v rámci skúšky je takýto:

— *Deň 1:* Označte každé zviera a zaznamenajte jeho hmotnosť a akékoľvek klinické pozorovania. Začnite s aplikáciou 25 µl z príslušného zriedenia testovanej látky, samotného nosiča alebo pozitívnej kontroly (súbežnej alebo nedávnej, podľa laboratórnych pravidiel s prihliadnutím na odseky 11 – 15) na zadnú stranu každého ucha.

— *Dni 2 a 3:* Zopakujte aplikačný postup uskutočnený v deň 1.

— *Deň 4:* Žiadne ošetrenie.

— *Deň 5:* Intraperitoneálnou injekciou aplikujte 0,5 ml (5 mg/myš) roztoku BrdU (10 mg/ml).

— *Deň 6:* Zaznamenajte hmotnosť každého zvieraťa a akékoľvek klinické príznaky. Približne o 24 hodín po injekčnej aplikácii roztoku BrdU sa zvieratá humánne usmrtia. Drénované ušné lymfatické uzliny sa odstránia z každého ucha myši a jednotlivo sa spracujú vo fosfátom tlmenom fyziologickom roztoku (PBS) pre každé zviera. Údaje a diagramy identifikácie lymfatických uzlín a disekcie možno nájsť v odkaze (17). Pri ďalšom monitorovaní lokálnej odozvy kože v hlavnej štúdii možno do protokolu štúdie zahrnúť ďalšie parametre, ako napríklad hodnotenie erytému ucha alebo merania hrúbky ucha (získané pomocou meradla hrúbky alebo vážením vzoriek uší pri pitve).

▼M3

Príprava bunkových suspenzií

26. Jednobunková suspenzia buniek lymfatických uzlín (LNC) odobraná bilaterálne z každej myši sa pripravuje jemným mechanickým pretlačením cez sitko z nerezovej ocele so šírkou oka 200 μm alebo inou prijateľnou technikou na prípravu jednobunkovej suspenzie (napr. pomocou plastového mažiara na jedno použitie, ktorým sa lymfatické uzliny rozdrvia a následne prepasírujú cez nylonové sitko #70.) Postup na prípravu suspenzie buniek lymfatických uzlín je v tejto skúške veľmi dôležitý, a preto by každý odborník mal byť v tomto postupe vopred vyškolený. Navyše keďže lymfatické uzliny zvierat v negatívnej kontrole sú malé, dôležité je opatrné zaobchádzanie, aby sa predišlo umelým účinkom na hodnoty SI. V každom prípade by sa cieľový objem suspenzie buniek lymfatických uzlín mal prispôsobiť stanovenému optimalizovanému objemu (približne 15 ml). Optimalizovaný objem je založený na dosiahnutí priemernej absorbancie v negatívnej kontrolnej skupine v rozmedzí 0,1 – 0,2.

Stanovenie proliferácie buniek (meranie obsahu BrdU v DNA lymfocytov)

27. BrdU sa meria metódou ELISA pomocou komerčnej testovacej súpravy (napr. Roche Applied Science, Mannheim, Nemecko, katalógové číslo 11 647 229 001). V skratke 100 μl suspenzie buniek lymfatických uzlín sa trikrát pridá do jamiek mikroplatničky. Po fixácii a denaturácii buniek lymfatických uzlín sa do každej jamky pridá protilátka BrdU a čaká sa na reakciu. Následne sa protilátka BrdU odstráni umytím, pridá sa substrátový roztok a čaká sa na tvorbu chromogénu. Odmeria sa absorbancia 370 nm s referenčnou vlnovou dĺžkou 492 nm. Vo všetkých prípadoch by sa testovacie podmienky skúšky mali optimalizovať (pozri odsek 26).

POZOROVANIA

Klinické pozorovania

28. Každá myš sa starostlivo vyšetrí aspoň jedenkrát denne na všetky klinické príznaky, či už ide o lokálne podráždenie v mieste aplikácie, alebo systémovú toxicitu. Všetky pozorovania sa systematicky zaznamenávajú, pričom každá myš má individuálny záznam. Plány na monitorovanie by mali zahŕňať kritériá na rýchlu identifikáciu tých myší, ktoré vykazujú systémovú toxicitu, nadmerné lokálne podráždenie alebo poleptanie kože a ktoré majú byť humánne usmrtené (31).

Telesné hmotnosti

29. Ako sa uvádza v odseku 25, hmotnosti jednotlivých zvierat by sa mali odmerať na začiatku testu a pri naplánovanom humánnom usmrtení zvierat.

VÝPOČET VÝSLEDKOV

30. Výsledky v každej pokusnej skupine sa vyjadrujú ako priemerná hodnota stimulačného indexu (SI). SI sa vypočíta vydelením priemerného indexu označenia BrdU/myš v rámci každej skupiny, ktorej sa podáva testovaná látka, a pozitívnej kontrolnej skupiny priemerným indexom označenia BrdU v kontrolnej skupine s rozpúšťadlom/nosičom. Priemerná hodnota SI kontrolných skupín, ktorým sa podával nosič, je potom 1.

Index označenia BrdU sa definuje ako:

$$\text{Index označenia BrdU} = (\text{ABS}_{em} - \text{ABS prázdny}_{em}) - (\text{ABS}_{ref} - \text{ABS prázdny}_{ref}),$$

kde: em = emisná vlnová dĺžka a ref = referenčná vlnová dĺžka.

▼M3

31. V rozhodovacom procese sa za pozitívny výsledok považuje stimulačný index ≥ 1,6 (10). Pri určovaní toho, či hraničný výsledok (napr. hodnota SI v rozmedzí od 1,6 do 1,9) je pozitívny, sa však môže použiť aj sila vzťahu medzi dávkou a odozvou, štatistický význam a konzistentnosť rozpúšťadla/nosiča a odoziev pozitívnej kontroly (3) (6) (32).

32. Pri hraničnom výsledku SI od 1,6 do 1,9 môžu používatelia na potvrdenie toho, že také výsledky sú pozitívne, zvážiť doplňujúce informácie, ako napríklad vzťah medzi dávkou a odozvou, dôkazy systémovej toxicity alebo nadmerného podráždenia a v prípade potreby štatistický význam spolu s hodnotami SI (10). Pozornosť by sa mala venovať aj rôznym vlastnostiam testovanej látky vrátane toho, či má štrukturálny vzťah k látkam, ktoré sú známymi senzibilizátormi, či spôsobuje nadmerné podráždenie kože, a vrátane charakteru pozorovanej odozvy na dávku. Tieto a ostatné hľadiská sa podrobne rozoberajú inde (4).

33. Zber údajov na úrovni jednotlivých myší umožní vykonať štatistickú analýzu prítomnosti a úrovne vzťahu medzi dávkou a odozvou v údajoch. Každé štatistické posúdenie by mohlo zahŕňať hodnotenie vzťahu medzi dávkou a odozvou, ako aj vhodne upravené porovnávania testovaných skupín (napr. porovnávania v pároch skupiny, ktorej sa podáva dávka, a súbežnej kontrolnej skupiny s rozpúšťadlom/nosičom). Štatistické analýzy môžu zahŕňať napr. lineárnu regresiu alebo Williamsov test na posúdenie trendov vo vzťahu medzi dávkou a odozvou a Dunnettov test na porovnávanie v pároch. Pri výbere vhodnej metódy štatistickej analýzy by si výskumný pracovník mal uvedomovať možné nerovnosti rozdielov a ďalšie súvisiace problémy, ktoré si môžu vyžadovať premenu údajov alebo štatistickú analýzu založenú na iných ako parametrických údajoch. Výskumný pracovník bude možno v každom prípade musieť vykonať výpočty SI a štatistické analýzy s určitými dátovými bodmi a bez nich (niekedy sa tieto údaje nazývajú „extrémne hodnoty“).

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

34. Údaje by sa mali zhrnúť vo forme tabuľky, v ktorej sa uvádzajú hodnoty indexu označenia BrdU jednotlivých zvierat, priemerný skupinový index označenia BrdU/zviera, súvisiaci rozsah chyby (napr. SD, SEM) a stredná hodnota SI pre každú skupinu s dávkou v porovnaní so súbežnou kontrolnou skupinou s rozpúšťadlom/nosičom.

Správa o teste

35. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testované a kontrolné chemické látky:

— identifikačné údaje (napr. čísla CAS, čísla EC, ak sú k dispozícii, zdroj, čistota, známe nečistoty, číslo šarže),

— fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti (napr. prchavosť, stabilita, rozpustnosť),

— v prípade zmesi zloženie a relatívny percentuálny podiel zložiek.

Rozpúšťadlo/nosič:

— identifikačné údaje (čistota, v prípade potreby koncentrácia, použitý objem),

— zdôvodnenie voľby nosiča.

▼M3

Testovacie zvieratá:

— použitý kmeň myší CBA,

— mikrobiologický stav zvierat, ak je známy,

— počet a vek zvierat,

— zdroj zvierat, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

Podmienky testu:

— zdroj, číslo šarže a kontrolné údaje výrobcu o kvalite/presnosti (citlivosť a špecifickosť protilátky a limit detekcie) pre súpravu ELISA,

— informácie o príprave a aplikácii testovanej látky,

— zdôvodnenie výberu dávky (vrátane výsledkov z predbežného skríningového testu, ak sa uskutočnil),

— použité koncentrácie nosiča a testovanej látky a celkové množstvo aplikovanej testovanej látky,

— údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu/zdroja krmiva, zdroja vody),

— podrobný opis harmonogramu podávania dávok a odberu vzoriek,

— metódy merania toxicity,

— kritériá na hodnotenie štúdií ako pozitívnych alebo negatívnych,

— informácie o akýchkoľvek odchýlkach od protokolu a vysvetlenie, ako odchýlky ovplyvňujú návrh a výsledky štúdie.

Kontrola spoľahlivosti:

— súhrn výsledkov poslednej kontroly spoľahlivosti vrátane informácií o testovanej látke, koncentrácii a použitom nosiči,

— súbežné a/alebo historické kontrolné údaje o pozitívnej a súbežnej negatívnej kontrole (s rozpúšťadlom/nosičom) pre testovacie laboratórium,

— ak nebola zahrnutá súbežná pozitívna kontrola, dátum a laboratórna správa o najaktuálnejšej periodickej pozitívnej kontrole a správa s historickými údajmi o pozitívnej kontrole, ktorými laboratórium zdôvodňuje nevykonanie súbežnej pozitívnej kontroly.

Výsledky:

— hmotnosti jednotlivých myší na začiatku podávania dávky a pri naplánovanom humánnom usmrtení, ako aj priemerný a súvisiaci rozsah chyby (napr. SD a SEM) pre každú pokusnú skupinu,

— časový priebeh nástupu príznakov toxicity u každého zvieraťa vrátane podráždenia kože v mieste podania látky, ak sa vyskytnú,

— tabuľka indexov označenia BrdU u jednotlivých myší a hodnoty SI v každej pokusnej skupine,

— priemerný a súvisiaci rozsah chyby (napr. SD, SEM) v súvislosti s indexom označenia BrdU/myš v každej pokusnej skupine a výsledky analýzy extrémnej hodnoty v každej pokusnej skupine,

▼M3

— výpočet SI a vhodné opatrenie variability, ktoré berie do úvahy variabilitu medzi zvieratami v skupinách, ktorým sa podáva testovaná látka, a v kontrolných skupinách,

— vzťah medzi dávkou a odozvou,

— v prípade potreby štatistické analýzy.

Rozbor výsledkov:

— stručný komentár v súvislosti s výsledkami, analýza odozvy na dávku, štatistické analýzy, ak existujú, s uvedením záveru, či by sa testovaná látka mala považovať za látku spôsobujúcu senzibilizáciu kože.

LITERATÚRA

1. OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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. K dispozícii na stránke: [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 – 579.

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. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼**M3**

DODATOK 1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: Miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o opatrenie výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa ako synonymum s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (33).

Referenčná látka: Látka spôsobujúca alebo nespôsobujúca senzibilizáciu, ktorá sa používa ako štandardná látka na porovnávanie s testovanou látkou. Referenčná látka by mala mať tieto vlastnosti: i) konzistentný(-é) a spoľahlivý(-é) zdroj(-e); ii) štrukturálnu a funkčnú podobnosť s triedou látok, ktoré sa budú testovať; iii) známe fyzikálno-chemické vlastnosti; iv) podporné údaje o známych účinkoch a v) známu potenciu v rozsahu želanej odozvy.

Falošný negatívny výsledok: Testovaná látka je testovanou metódou nesprávne identifikovaná ako negatívna alebo neaktívna, pričom v skutočnosti je pozitívna alebo aktívna (33).

Falošný pozitívny výsledok: Testovaná látka je testom nesprávne identifikovaná ako pozitívna alebo aktívna, pričom v skutočnosti je negatívna alebo neaktívna (33).

Nebezpečnosť: Potenciál škodlivého účinku na zdravie alebo životné prostredie. Škodlivý účinok sa prejavuje až pri dostatočnej hladine expozície.

Medzilaboratórna reprodukovateľnosť: Miera, do akej rôzne kvalifikované laboratóriá, ktoré používajú rovnaký protokol a testujú rovnaké testovacie látky, dokážu dosiahnuť kvalitatívne a kvantitatívne podobné výsledky. Medzilaboratórna reprodukovateľnosť sa určuje počas postupov pred validáciou a v rámci postupov validácie a znamená mieru, do akej možno test úspešne prenášať medzi laboratóriami. Takisto je známa ako reprodukovateľnosť medzi laboratóriami (33).

Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť: Určenie miery, do akej kvalifikovaní pracovníci v rámci jedného laboratória dokážu úspešne opakovať výsledky s použitím konkrétneho protokolu v rôznom čase. Takisto je známa ako reprodukovateľnosť v rámci laboratória (33).

Extrémna hodnota: Extrémna hodnota je pozorovanie, ktoré je značne odlišné od ostatných hodnôt v náhodnej vzorke z populácie.

Zabezpečovanie kvality: Riadiaci proces, v ktorom jednotlivci nezávislí od osôb vykonávajúcich testy posudzujú súlad s laboratórnymi testovacími normami, požiadavkami a postupmi vedenia záznamov, ako aj presnosť prenosu údajov.

Spoľahlivosť: Meria rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia opakovane vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti (33).

Senzibilizácia kože: Imunologický proces, ku ktorému dochádza po lokálnom vystavení náchylného jednotlivca chemickému alergénu, ktorý vyvoláva kožnú imunitnú odozvu, ktorá môže viesť k vzniku kontaktnej senzibilizácie.

Stimulačný index (SI): Hodnota vypočítaná na posúdenie potenciálu testovanej látky spôsobiť senzibilizáciu kože; ide teda o pomer proliferácie v pokusných skupinách a proliferácie v súbežných kontrolných skupinách, ktorým sa podáva nosič.

Testovaná látka (tiež sa nazýva testovaná chemikália): Akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M4

B.52. AKÚTNA INHALAČNÁ TOXICITA – METÓDA AKÚTNEJ TOXICKEJ TRIEDY

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov (TG) 436 (2009). Prvé usmernenia TG 403 na vykonávanie testov akútnej inhalácie boli prijaté v roku 1981 a medzičasom boli revidované [pozri kapitolu B.2 tejto prílohy (1)]. Po prijatí revidovanej metódy orálnej akútnej toxickej triedy (ATC) (kapitola B.1b tejto prílohy) (5) sa považovalo za vhodné vypracovať metódu inhalačnej ATC (2) (3) (4). Z retrospektívneho hodnotenia výkonnosti metódy ATC pre akútnu inhalačnú toxicitu vyplynulo, že metóda je vhodná na účely klasifikácie a označovania (6). Testovacia metóda inhalačnej ATC umožní použitie po sebe nasledujúcich stupňov pevne stanovených cieľových koncentrácií na účely klasifikácie toxicity testovanej chemikálie. Kľúčovým parametrom je letalita, ale zvieratá, ktoré majú bolesti, trpia alebo sú moribundné, by sa mali humánne utratiť, aby sa minimalizovalo ich utrpenie. Usmernenia k humánnym parametrom sú k dispozícii v usmerňovacom dokumente OECD č. 19 (7).

2. Usmernenia k vykonaniu a interpretácii tejto testovacej metódy sú k dispozícii v Usmerňovacom dokumente č. 39 o testovaní akútnej inhalačnej toxicity (GD 39) (8).

3. Vymedzenie pojmov použitých v súvislosti s touto testovacou metódou je uvedené v dodatku 1 a v dokumente GD 39 (8).

4. Testovacia metóda poskytuje informácie o nebezpečných vlastnostiach a umožňuje, aby bolo možné testovanú chemikáliu zatriediť a klasifikovať podľa nariadenia (ES) č. 1272/2008 o klasifikácii chemikálií, ktoré spôsobujú akútnu toxicitu (9). V prípade, že sa vyžadujú bodové odhady hodnôt LC_{50} alebo analýzy vzťahu koncentrácie a reakcie, je kapitola B.2 tejto prílohy (1) vhodnou testovacou metódou, ktorú možno použiť. Ďalšie usmernenia o výbere testovacej metódy sú uvedené v dokumente GD 39 (8). Táto testovacia metóda nie je osobitne určená na testovanie špecializovaných materiálov, ako sú slabo rozpustné izometrické alebo vláknité materiály alebo priemyselne vyrábané nanomateriály.

ÚVODNÉ ÚVAHY

5. Pred zvažovaním testovania podľa tejto testovacej metódy by testovacie laboratórium malo zohľadniť všetky dostupné informácie o testovanej chemikálii vrátane existujúcich štúdií obsahujúcich údaje, na základe ktorých sa ďalšie testovanie neodporúča s cieľom minimalizovať využívanie zvierat. Informácie, ktoré môžu pomôcť pri výbere najvhodnejšieho druhu, kmeňa, pohlavia, spôsobu expozície a primeraných testovacích koncentrácií, zahŕňajú identitu, chemickú štruktúru a fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie, výsledky všetkých testov toxicity *in vitro* alebo *in vivo*, predpokladané použitia a potenciál expozície človeka, dostupné údaje (Q)SAR a toxikologické údaje o štrukturálne príbuzných chemikáliách. Koncentrácie, pri ktorých sa predpokladá, že spôsobia silnú bolesť a utrpenie v dôsledku žieravého ([1]) alebo silno dráždivého pôsobenia, by sa nemali testovať podľa tejto testovacej metódy [pozri dokument GD 39 (8)].

([1]) Hodnotenie žieravosti môže byť založené na odbornom posudku s využitím takých dôkazov, ako sú: skúsenosti u ľudí a pri zvieratách, existujúce údaje (in vitro), napr. kapitola B.40 (10), B.40a (11) tejto prílohy alebo dokument OECD TG 435 (12), hodnoty pH, informácie o podobných chemikáliách alebo akékoľvek iné súvisiace údaje.

▼M4

PRINCÍP TESTU

6. Princíp testu spočíva v tom, že v rámci postupu niekoľkých krokov sa v priebehu expozície v trvaní štyroch hodín o akútnej inhalačnej toxicite testovanej chemikálie získajú dostatočné informácie, ktoré umožnia jej klasifikáciu. Na špecifické regulačné účely možno použiť iné intervaly expozície. V každom kroku, pre ktorý je vymedzená koncentrácia, sa testujú tri zvieratá z každého pohlavia. V závislosti od mortality a/alebo moribundného stavu zvierat môžu na posúdenie akútnej toxicity testovanej chemikálie postačovať dva kroky. Ak sú k dispozícii dôkazy o tom, že jedno pohlavie je vnímavejšie ako druhé, potom môže test pokračovať s využitím iba vnímavejšieho pohlavia. V závislosti od výsledku predchádzajúceho kroku bude nasledovať tento krok:

a) nie je potrebné ďalšie testovanie;

b) testovanie troch zvierat z každého pohlavia alebo

c) testovanie šiestich zvierat vnímavejšieho pohlavia, t. j. nižšie hraničné odhady toxickej triedy budú založené na šiestich zvieratách v každej skupine s koncentráciou bez ohľadu na pohlavie.

7. Moribundné zvieratá alebo zvieratá so zjavnými bolesťami, alebo zvieratá, ktoré vykazujú príznaky silného a trvalého utrpenia, by sa mali humánnym spôsobom usmrtiť, pričom pri interpretácii výsledkov testu sa vyhodnocujú rovnako ako zvieratá, ktoré uhynuli pri teste. Kritériá na rozhodnutie usmrtiť moribundné alebo silne trpiace zvieratá a usmernenie o uznaní predvídateľnej alebo nastávajúcej smrti sú predmetom Usmerňovacieho dokumentu č. 19 o humánnych parametroch (Humane Endpoints Guidance Document) (7).

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

8. Používajú sa zdravé mladé dospelé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Najvhodnejším zvieraťom je potkan. Použitie iných druhov zvierat je nutné odôvodniť.

Príprava zvierat

9. Používajú sa samice, ktoré nikdy nevrhli mláďatá a sú negravidné. V deň expozície by zvieratá mali byť mladé dospelé jedince vo veku od 8 do 12 týždňov a ich telesná hmotnosť by mala byť v rozmedzí ± 20 % strednej hmotnosti jednotlivých pohlaví všetkých zvierat toho istého veku, ktoré boli exponované skôr. Zvieratá sa vyberajú náhodne a označia sa na účely individuálnej identifikácie. Zvieratá sa umiestnia do klietok najmenej na päť dní pred začatím testu, aby sa aklimatizovali na laboratórne podmienky. Zvieratá by sa na krátky čas pred testovaním mali aklimatizovať aj na testovacie zariadenie, lebo sa tak zníži stres spôsobený uvedením do nového prostredia.

Chov zvierat

10. Teplota miestnosti, kde sa pokusné zviera chová, by mala byť 22 ± 3 °C. Relatívna vlhkosť by sa v ideálnom prípade mala udržiavať v rozsahu od 30 do 70 %, hoci to nemusí byť možné, ak sa ako nosič používa voda. Pred a po expozícii sú zvieratá zvyčajne umiestnené v klietkach podľa pohlavia a koncentrácie, ale počet zvierat v jednej klietke by nemal prekážať bezproblémovému pozorovaniu každého zvieraťa, pričom by sa mali minimalizovať straty súvisiace so vzájomným požieraním alebo bojom jedincov. V prípade, že sa použije iba expozícia oblasti nosa, môže byť potrebné, aby sa zvieratá aklimatizovali na skúmavky obmedzujúce pohyb. Skúmavky by nemali zvieratám spôsobovať neprimeraný stres súvisiaci s fyzikálnymi vlastnosťami, teplotou alebo obmedzením pohybu. Obmedzenie môže mať vplyv na fyziologické sledované parametre, ako sú telesná teplota (hypertermia) a/alebo respiračný minútový objem. Ak sú k dispozícii všeobecné údaje, podľa ktorých k takýmto zmenám nedochádza vo veľkej miere,

▼M4

potom skúmavky nie je potrebné vopred upraviť. Zvieratá vystavené účinkom aerosólu celým telom by sa mali v priebehu expozície umiestniť samostatne, aby sa zabránilo filtrovaniu testovaného aerosólu cez srsť ostatných zvierat v klietke. S výnimkou času trvania expozície sa na kŕmenie môže používať bežné a osvedčené laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou miestnej pitnej vody. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy.

Inhalačné komory

11. Pri výbere inhalačnej komory by sa mal vziať do úvahy charakter testovanej chemikálie a cieľ testu. Uprednostňuje sa expozícia oblasti nosa (pričom tento pojem zahŕňa expozíciu hlavy, nosa alebo pysku). Vo všeobecnosti sa pri štúdiách kvapalných alebo tuhých aerosólov a pár, ktoré môžu kondenzovať a vytvárať aerosóly, uprednostňuje expozícia oblasti nosa. Špeciálne ciele štúdie možno lepšie dosiahnuť použitím expozície celého tela, ale tento krok je potrebné v správe o štúdii odôvodniť. Na zabezpečenie stability prostredia pri používaní komory na expozíciu celého tela by celkový objem testovaných zvierat nemal presiahnuť 5 % objemu komory. Princípy metód expozície celého tela a oblasti nosa a ich konkrétne výhody a nevýhody sú opísané v dokumente GD 39 (8).

PODMIENKY EXPOZÍCIE

Podávanie koncentrácií

12. Odporúča sa použitie stabilného intervalu expozície v trvaní štyroch hodín, do ktorých nie je započítaný čas na dosiahnutie rovnováhy. Na splnenie špecifických požiadaviek môžu byť nutné iné intervaly, v správe o štúdii však treba uviesť odôvodnenie [pozri dokument GD 39 (8)]. Zvieratá exponované v komorách na expozíciu celého tela by mali byť umiestnené samostatne, aby sa zabránilo požitiu testovanej chemikálie v dôsledku očisťovania tela ostatnými zvieratami v klietke. Počas trvania expozície by sa zviera nemalo kŕmiť. V priebehu expozície celého tela sa zvieraťu môže podať voda.

13. Zvieratá sú vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie vo forme plynu, pary, aerosólu alebo ich kombinácie. Fyzikálne skupenstvo, ktoré sa testuje, závisí od fyzikálno-chemických vlastností testovanej chemikálie, zvolenej koncentrácie a/alebo najpravdepodobnejšej fyzikálnej formy pri manipulácii a používaní testovanej chemikálie. Hygroskopické a chemicky reaktívne testované chemikálie by sa mali testovať v podmienkach suchého vzduchu. Treba dbať na to, aby sa nevytvorili výbušné koncentrácie.

Rozdelenie veľkosti častíc

14. Častice by sa mali rozdeliť podľa veľkosti v prípade všetkých aerosólov a pár, ktoré môžu kondenzovať a vytvárať aerosóly. Na umožnenie expozície všetkých relevantných oblastí dýchacej sústavy sa odporúčajú aerosóly so stredným aerodynamickým hmotnostným priemerom (MMAD) v rozsahu od 1 do 4 μm so štandardnou odchýlkou geometrického priemeru (σ_g) v rozsahu od 1,5 do 3,0 (8) (13) (14). Hoci by sa malo vynaložiť značné úsilie na dodržanie tejto normy, pokiaľ túto podmienku nie je možné splniť, treba predložiť odborný posudok. Napríklad v prípade kovových dymov môžu byť častice menšie, ako stanovuje táto norma, a takisto nabité častice, vlákna a hygroskopické materiály (ktoré sa vo vlhkom prostredí dýchacej sústavy zväčšujú) môžu túto normu prekračovať.

▼M4

Príprava testovanej chemikálie v nosiči

15. Na prípravu vhodnej koncentrácie a veľkosti častíc testovanej chemikálie v ovzduší možno použiť nosič. Spravidla sa uprednostňuje voda. Tuhý materiál môže byť podrobený mechanickým procesom s cieľom dosiahnuť požadovanú distribúciu veľkosti častíc, treba však dbať na to, aby sa testovaná chemikália nerozložila ani nezmenila. V prípadoch, v ktorých sa usudzuje, že sa pôsobením mechanických procesov zmenilo zloženie testovanej chemikálie (napr. extrémna teplota spôsobená nadmerným mletím v dôsledku trenia), by sa zloženie testovanej chemikálie malo analyticky overiť. Treba dať pozor, aby sa testovaná chemikália neznečistila. Nie je potrebné testovať nedrobivé granulované materiály, ktoré sa účelovo pripravujú tak, aby nebolo možné ich inhalovať. Na preukázanie, že pri manipulácii s granulovaným materiálom nevznikajú dýchateľné častice, by sa mal vykonať test opotrebovania. Ak pri teste opotrebovania vzniknú dýchateľné častice, treba uskutočniť test inhalačnej toxicity.

Kontrolné zvieratá

16. Súbežná negatívna kontrolná skupina (ovzdušia) nie je potrebná. V prípade, že sa na vytvorenie testovacieho ovzdušia použije iný nosič ako voda, sa kontrolná skupina nosiča použije iba vtedy, ak nie sú k dispozícii staršie údaje o inhalačnej toxicite. Ak sa pri štúdii toxicity testovanej chemikálie pripravenej v nosiči nezistí žiadna toxicita, znamená to, že nosič pri testovanej koncentrácii nie je toxický, a teda kontrola nosiča nie je potrebná.

MONITOROVANIE PODMIENOK EXPOZÍCIE

Prúdenie vzduchu v komore

17. Prúdenie vzduchu cez komoru by sa počas každej expozície malo dôkladne kontrolovať, nepretržite monitorovať a zaznamenávať aspoň raz za hodinu. Monitorovanie koncentrácie testovacieho ovzdušia (alebo stability) je integrálne meranie všetkých dynamických parametrov a poskytuje nepriamy prostriedok kontroly všetkých relevantných dynamických parametrov tvorby ovzdušia. Osobitne treba dbať na to, aby sa zabránilo opätovnému vdýchnutiu v komorách na expozíciu oblasti nosa v prípadoch, v ktorých prúdenie vzduchu cez systém expozície nestačí na zabezpečenie dynamického prúdenia vzduchu s testovanou chemikáliou. Existujú predpísané metodiky, prostredníctvom ktorých možno dokázať, že v zvolených prevádzkových podmienkach nedochádza k opätovnému vdýchnutiu (8) (15). Koncentrácia kyslíka by mala byť minimálne 19 % a koncentrácia oxidu uhličitého by nemala presiahnuť 1 %. Ak existuje dôvod domnievať sa, že tieto normy nie je možné splniť, koncentrácie kyslíka a oxidu uhličitého by sa mali zmerať.

Teplota komory a relatívna vlhkosť

18. Komora by sa mala udržiavať pri teplote 22 ± 3 °C. Relatívna vlhkosť v dýchacej zóne zvierat, a to v prípade expozície oblasti nosa, ako aj v prípade expozície celého tela, by sa mala monitorovať a zaznamenávať minimálne trikrát počas expozície v trvaní až štyroch hodín a v prípade kratšej expozície každú hodinu. Relatívna vlhkosť by sa ideálne mala udržiavať v rozsahu od 30 do 70 %, ale môže sa stať, že táto hodnota bude nedosiahnuteľná (napr. v prípade testovania zmesí na báze vody) alebo nemerateľná z dôvodu interferencie testovanej chemikálie a testovacej metódy.

▼M4

Testovaná chemikália: nominálna koncentrácia

19. Vždy, keď je to možné, by sa mala vypočítať a zaznamenať nominálna koncentrácia expozície v komore. Nominálna koncentrácia je hmotnosť vytvorenej testovanej chemikálie vydelená celkovým objemom vzduchu, ktorý prešiel systémom komory. Nominálna koncentrácia sa nepoužíva na charakterizáciu expozície zvierat, ale porovnanie nominálnej a skutočnej koncentrácie vypovedá o účinnosti vytvárania testovacieho systému, a teda sa môže použiť na zistenie problémov s tvorbou.

Testovaná chemikália: skutočná koncentrácia

20. Skutočná koncentrácia je koncentrácia testovanej chemikálie v dýchacej zóne zvierat v inhalačnej komore. Skutočné koncentrácie možno získať špecifickými metódami (napr. priamym odberom vzorky, adsorpčnými alebo chemicky reaktívnymi metódami a následnou analytickou charakterizáciou) alebo nešpecifickými metódami, ako je gravimetrická filtrová analýza. Použitie gravimetrickej analýzy je prípustné iba v prípade jednozložkových práškových aerosólov alebo aerosólov kvapalín s nízkou prchavosťou, pričom je potrebné túto analýzu podložiť primeranými testovými charakterizáciami predbežných štúdií týkajúcich sa konkrétnej testovanej chemikálie. Koncentráciu viaczložkových práškových aerosólov takisto možno stanoviť prostredníctvom gravimetrickej analýzy. V tom prípade sú však potrebné analytické údaje, ktoré dokazujú, že zloženie materiálu vo vzduchu je podobné ako zloženie východiskového materiálu. Ak tieto informácie nie sú dostupné, môže byť potrebná opätovná analýza testovanej chemikálie (ideálne v jej skupenstve v ovzduší) v pravidelných intervaloch v priebehu štúdie. V prípade aerosólových látok, ktoré sa môžu vypariť alebo môžu sublimovať, by sa malo preukázať, že všetky fázy sa zhromaždili pomocou zvolenej metódy. V správe o štúdii by sa mali uviesť cieľové, nominálne a skutočné koncentrácie. Na výpočet hodnôt smrteľných koncentrácií sa však v štatistických analýzach použijú iba skutočné koncentrácie.

21. Ak je to možné, mala by sa použiť jedna dávka testovanej chemikálie, pričom testovaná vzorka by sa mala uskladniť za podmienok, za ktorých sa zachová jej čistota, homogenita a stabilita. Pred začatím štúdie by mala byť k dispozícii charakterizácia testovanej chemikálie vrátane jej čistoty a, ak je to technicky možné, identity a množstiev identifikovaných kontaminantov a prímesí. Charakterizáciu možno preukázať napríklad týmito údajmi: retenčný čas a relatívna plocha píku, molekulová hmotnosť získaná pomocou analýzy hmotnostnej spektrometrie alebo plynovej chromatografie alebo iné odhady. Hoci za identitu testovanej vzorky testovacie laboratórium nenesie zodpovednosť, je vhodné, aby testovacie laboratórium aspoň čiastočne potvrdilo charakterizáciu poskytnutú dodávateľom (napr. farbu, fyzikálne skupenstvo atď.).

22. Prostredie expozície by malo byť čo najstálejšie a malo by sa nepretržite a/alebo občasne monitorovať v závislosti od metódy analýzy. Ak sa použije občasný odber vzoriek, vzorky ovzdušia komory by sa mali v priebehu štvorhodinovej štúdie odobrať najmenej dvakrát. Ak to pre nízky prietok vzduchu alebo nízke koncentrácie nie je možné, môže sa v priebehu celého intervalu expozície odobrať jedna vzorka. Ak sa medzi jednotlivými vzorkami vyskytnú výrazné výkyvy, pri ďalších testovaných koncentráciách by sa mali použiť štyri vzorky z každej expozície. Jednotlivé vzorky koncentrácie v komore by sa nemali od strednej koncentrácie v komore odchýliť o viac ako ± 10 % v prípade plynov a pár a o viac ako ± 20 % v prípade kvapalných alebo tuhých aerosólov. Čas na dosiahnutie rovnováhy v komore (t_{95}) by sa mal vypočítať a zaznamenať. Interval expozície zahŕňa čas, keď sa testovaná chemikália tvorí, pričom sa zohľadňujú aj časy potrebné na dosiahnutie t_{95}. Usmernenia k odhadovaniu t_{95} sú uvedené v dokumente GD 39 (8).

▼M4

23. V prípade veľmi komplexných zmesí tvorených parami/plynmi a aerosólov (napr. spaľovacieho ovzdušia a testovaných chemikálií poháňaných účelovými výrobkami/zariadeniami koncového použitia) sa v inhalačnej komore môže každá fáza správať inak, takže by sa mala vybrať aspoň jedna látka slúžiaca ako ukazovateľ (analyt), najčastejšie hlavná aktívna látka v zmesi, každej fázy (para/plyn a aerosól). Ak je testovaná chemikália zmes, v správe by sa mala uviesť analytická koncentrácia celej zmesi, nielen aktívnej látky alebo zložky (analyt). Ďalšie informácie týkajúce sa skutočných koncentrácií sú uvedené v dokumente GD 39 (8).

Testovaná chemikália: rozdelenie veľkosti častíc

24. Rozdelenie veľkosti častíc aerosólov by sa malo stanoviť aspoň dvakrát v priebehu každej expozície v trvaní štyroch hodín, a to pomocou kaskádového impaktora alebo alternatívneho prístroja, ako je napríklad aerodynamický spektrometer častíc. Ak možno preukázať rovnocennosť výsledkov získaných pomocou kaskádového impaktora a alternatívneho prístroja, potom sa alternatívny prístroj môže používať počas celej štúdie. Druhé zariadenie, ako je gravimetrický filter alebo impinger/premývačka, by sa malo použiť súbežne s hlavným prístrojom na potvrdenie zachytávacej účinnosti hlavného prístroja. Hmotnostná koncentrácia získaná analýzou veľkosti častíc by mala byť v rozsahu primeraných limitov hmotnostnej koncentrácie získanej filtrovou analýzou [pozri dokument GD 39 (8)]. Ak možno preukázať rovnocennosť v počiatočnej fáze štúdie, nie je potrebné vykonávať ďalšie potvrdzujúce merania. V záujme zabezpečenia dobrých životných podmienok pre zvieratá by sa mali prijať opatrenia na minimalizáciu nejednoznačných údajov, ktoré môžu viesť k potrebe opakovať expozíciu. Rozdelenie veľkosti častíc by sa malo vykonať v prípade pár, ak existuje možnosť, že kondenzácia pary môže mať za následok tvorbu aerosólu, alebo ak sa v ovzduší pár zistia častice s potenciálom zmiešaných fáz (pozri odsek 14).

POSTUP

Základný test

25. V každom kroku sa použijú tri zvieratá z každého pohlavia alebo šesť zvierat vnímavejšieho pohlavia. Ak sa v prípade iných hlodavcov ako potkanov použije expozícia oblasti nosa, maximálne trvanie expozície je možné prispôsobiť s cieľom minimalizovať druhovo špecifické utrpenie. Úroveň koncentrácie, ktorá sa použije ako počiatočná dávka, sa vyberie zo štyroch stabilných úrovní, pričom počiatočná úroveň koncentrácie by mala byť tá, pri ktorej sa pri exponovaných zvieratách s najväčšou pravdepodobnosťou vyskytne toxicita. Schémy testovania pre plyny, pary a aerosóly (vrátane schém uvedených v dodatkoch 2 – 4) predstavujú testovanie s hraničnými hodnotami kategórií CLP 1 – 4 (9) v prípade plynov (100; 500; 2 500; 20 000 ppm/4 h) (dodatok2), v prípade pár (0,5; 2; 10; 20 mg/l/4 h) (dodatok 3) a v prípade aerosólov (0,05; 0,5; 1; 5 mg/l/4 h) (dodatok 4). Kategória 5, ktorá nie je začlenená do nariadenia (ES) č. 1272/2008, (9) sa týka vyšších koncentrácií, ako sú príslušné limitné koncentrácie. Pre každú počiatočnú koncentráciu platí tá istá schéma testovania. V závislosti od počtu zvierat usmrtených humánnym spôsobom alebo uhynutých sa postup testovania uskutočňuje podľa naznačených šípok, až kým nie je možné chemikáliu kategorizovať.

26. Časový interval medzi skupinami expozícií je určený nástupom, trvaním a závažnosťou príznakov toxicity. Expozícia zvierat pri ďalšej úrovni koncentrácie by sa mala odložiť, kým sa nenadobudne dostatočná dôvera, že zvieratá, ktoré boli testované, prežijú. Medzi expozíciami pri jednotlivých úrovniach koncentrácie sa odporúča interval tri alebo štyri dni, aby sa umožnilo pozorovanie oneskorenej toxicity. Časový interval sa môže nastaviť podľa potreby, napr. v prípade nepresvedčivej reakcie.

▼M4

Limitný test

27. Limitný test sa používa, ak je známe alebo sa predpokladá, že testovaná chemikália je v podstate netoxická, t. j. vyvoláva toxickú reakciu iba pri vyššej koncentrácii, ako je regulačná limitná koncentrácia. Informácie o toxicite testovanej chemikálie možno získať z poznatkov o podobných testovaných látkach alebo podobných zmesiach pri zohľadnení identity a percenta zložiek, o ktorých je známe, že sú toxikologicky významné. V týchto situáciách, keď existuje málo informácií alebo neexistujú žiadne informácie o jej toxicite, alebo ak sa očakáva, že testovaná chemikália bude toxická, je potrebné vykonať základný test [ďalšie usmernenia sú uvedené v dokumente GD 39 (8)].

28. Podľa bežného postupu sa tri zvieratá z každého pohlavia alebo šesť zvierat vnímavejšieho pohlavia vystaví koncentrácii 20 000 ppm v prípade plynov, 20 mg/l v prípade pár a 5 mg/l v prípade prachu/hmly (ak je to možné), ktorá v rámci tejto testovacej metódy slúži ako limitný test. Pri testovaní aerosólov by hlavným cieľom malo byť dosiahnutie dýchateľnej veľkosti častíc (t. j. MMAD 1 – 4 μm). V prípade väčšiny testovaných chemikálií je túto veľkosť možné dosiahnuť pri koncentrácii 2 mg/l. O testovanie aerosólov pri vyššej koncentrácii ako 2 mg/l sa možno pokúšať, iba ak je možné získať dýchateľnú veľkosť častíc [pozri dokument GD 39 (8)]. Podľa Globálneho harmonizovaného systému (GHS) (16) sa z dôvodu starostlivosti o zvieratá neodporúča testovanie pri vyššej koncentrácii, ako je limitná koncentrácia. Testovanie v kategórii 5 systému GHS (16), ktorá nie je plne začlenená do nariadenia (ES) č. 1272/2008 (9), by sa malo zvažovať iba vtedy, ak existuje vysoká pravdepodobnosť, že výsledky takéhoto testu by mali priamy význam pre ochranu ľudského zdravia, pričom do správy o štúdii sa uvedie odôvodnenie. V prípade potenciálne výbušných testovaných chemikálií treba dbať na to, aby nenastali podmienky, ktoré by mohli viesť k výbuchu. S cieľom zabrániť zbytočnému využívaniu zvierat by sa malo pred limitným testom vykonať testovacie kolo bez zvierat, aby sa zabezpečilo, že v komore je možné dosiahnuť podmienky na účely limitného testu.

POZOROVANIA

29. Zvieratá by sa mali v priebehu trvania expozície pravidelne klinicky pozorovať. Po expozícii by sa mali klinické pozorovania vykonať najmenej dvakrát v deň expozície alebo častejšie, ak to indikuje reakcia zvierat na testovanie, a následne najmenej raz denne počas 14 dní. Dĺžka pozorovania nie je presne určená, ale mala by sa stanoviť podľa charakteru a času nástupu klinických príznakov a dĺžky obdobia zotavenia. Časy, keď sa objavia a zmiznú príznaky toxicity, sú dôležité, predovšetkým v prípade tendencie oneskorenia príznakov toxicity. Všetky pozorovania sa systematicky zaznamenávajú, pričom každé zviera má individuálny záznam. Moribundné zvieratá a zvieratá, ktoré majú silné bolesti a/alebo vykazujú pretrvávajúce príznaky silného utrpenia, by sa mali z dôvodu starostlivosti o zvieratá humánnym spôsobom utratiť. Pri vyšetrovaní klinických príznakov toxicity treba dávať pozor, aby sa počiatočný nepatrný nález a krátkodobé zmeny dýchania, ktoré sú dôsledkom expozície, nezamieňali za účinky súvisiace s aplikáciou chemikálie. Zohľadnia sa zásady a kritériá zhrnuté v Usmerňujúcom dokumente o humánnych parametroch (Humane Endpoints Guidance Document) (7). Keď sa zvieratá usmrtia z humánnych dôvodov alebo sa nájdu uhynuté, je potrebné čo možno najpresnejšie zaznamenať čas uhynutia.

▼M4

30. Pozorovania v klietkach sa zameriavajú na zmeny kože, srsti, očí, slizníc, dýchania, krvného obehu, autonómneho a centrálneho nervového systému, ako aj somatomotoriky a správania. Ak je to možné, zaznamená sa každý rozdiel medzi lokálnymi a systémovými účinkami. Pozornosť sa zameriava na pozorovanie triašky, kŕčov, slinenia, hnačky, letargie, spánku a kómy. Meraním rektálnej teploty možno získať dôkazy svedčiace o reflexnej bradypney alebo hypo/hypertermii, ktoré súvisia s testovaním alebo s obmedzením pohybu.

Telesné hmotnosti

31. Individuálne hmotnosti zvierat by sa mali zaznamenať raz počas obdobia aklimatizácie, v deň expozície pred expozíciou (deň 0), minimálne v dňoch 1, 3 a 7 (a následne raz za týždeň) a v čase uhynutia alebo utratenia, pokiaľ k nemu dôjde po dni 1. Telesná hmotnosť sa považuje za kritický ukazovateľ toxicity a zvieratá, pri ktorých nastane trvalý úbytok hmotnosti $\geq$ 20 % v porovnaní s hodnotami pred štúdiou, by sa mali pozorne sledovať. Zvieratá, ktoré prežijú, sa na konci obdobia po expozícii odvážia a humánne usmrtia.

Patológia

32. Všetky testované zvieratá vrátane tých, ktoré uhynú počas testu alebo sa utratia a vylúčia zo štúdie z dôvodu starostlivosti o zvieratá, sa podrobujú makroskopickej pitve. Ak nie je možné vykonať pitvu ihneď po objavení uhynutého zvieraťa, zviera sa schladí (nie zmrazí) na dostatočne nízku teplotu, aby sa minimalizovala autolýza. Pitvy by sa mali vykonať čo najskôr, zvyčajne v priebehu jedného alebo dvoch dní. Pri každom zvierati sa zaznamenajú všetky makroskopické patologické zmeny, pričom osobitná pozornosť sa venuje akýmkoľvek zmenám v dýchacej sústave.

33. Na účely zvýšenia výpovednej hodnoty štúdie možno zvážiť ďalšie vyšetrenia *a priori* zahrnuté od začiatku, ako je meranie hmotnosti pľúc potkanov, ktoré prežili, a/alebo poskytnutie dôkazov o podráždení prostredníctvom mikroskopického vyšetrenia dýchacej sústavy. Medzi skúmané orgány môžu patriť aj orgány, ktoré svedčia o makroskopickej patológii pri zvieratách, ktoré prežili 24 alebo viac hodín, a orgány, o ktorých je známe alebo pri ktorých sa predpokladá, že boli zasiahnuté. Mikroskopické vyšetrenie celej dýchacej sústavy môže poskytnúť užitočné informácie o testovaných chemikáliách, ktoré reagujú s vodou, ako sú kyseliny a hygroskopické testované chemikálie.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

34. Treba uviesť údaje o telesnej hmotnosti a pitevných nálezoch jednotlivých zvierat. Údaje z klinických pozorovaní sa zhrnú v podobe tabuliek, kde sa uvedie pre každú pokusnú skupinu počet použitých zvierat, počet zvierat vykazujúcich špecifické príznaky toxicity, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu alebo ich usmrtili z humánnych dôvodov, čas uhynutia jednotlivých zvierat, opis a časový priebeh toxických účinkov a reverzibility a pitevné nálezy.

▼M4

Správa o teste

35. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testované zvieratá a chov:

— opis podmienok v klietkach vrátane: počtu (alebo zmeny počtu) zvierat na klietku, výstelky, teploty prostredia a relatívnej vlhkosti, dĺžky svetlej fázy a identifikácie krmiva,

— použité druhy/kmene a odôvodnenie použitia druhov iných ako potkany,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— metóda randomizácie,

— údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu/zdroja krmiva, zdroja vody),

— opis akýchkoľvek podmienok pred testovaním vrátane krmiva, karantény a liečby chorôb.

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter, čistota a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti (vrátane izomerizácie),

— identifikačné údaje a registračné číslo CAS (Chemical Abstract Services), ak je známe.

Nosič:

— odôvodnenie použitia nosiča a odôvodnenie výberu nosiča (ak je iný ako voda),

— historické alebo súčasné údaje preukazujúce, že nosič nemá vplyv na výsledky štúdie.

Inhalačná komora:

— opis inhalačnej komory vrátane rozmerov a objemu,

— zdroj a opis zariadenia použitého na expozíciu zvierat, ako aj na vytvorenie ovzdušia,

— zariadenie na meranie teploty, vlhkosti, veľkosti častíc a skutočnej koncentrácie,

— zdroj vzduchu, manipulácia s dodaným/extrahovaným vzduchom a použitý klimatizačný systém,

— metódy použité na kalibráciu zariadenia s cieľom zabezpečiť homogénne testovacie ovzdušie,

— rozdiel tlakov (pozitívny alebo negatívny),

— expozičné otvory na jednu komoru (v prípade expozície oblasti nosa), umiestnenie zvierat v systéme (v prípade expozície celého tela),

— dočasná homogenita/stabilita testovacieho ovzdušia,

— umiestnenie senzorov teploty a vlhkosti a odber vzorky testovacieho ovzdušia v komore,

— hodnoty prietoku vzduchu, prietok vzduchu na jeden expozičný otvor (v prípade expozície oblasti nosa) alebo množstvo zvierat na komoru (v prípade expozície celého tela),

— informácie o zariadení použitom na meranie kyslíka a oxidu uhličitého, ak sa použilo,

▼M4

— čas potrebný na dosiahnutie rovnováhy v inhalačnej komore (t_{95}),

— počet zmien objemu za hodinu,

— meracie prístroje (ak sa použili).

Údaje o expozícii:

— odôvodnenie výberu cieľovej koncentrácie pre základnú štúdiu,

— nominálne koncentrácie (celková hmotnosť testovanej chemikálie aplikovanej do inhalačnej komory vydelená objemom vzduchu, ktorý prešiel komorou),

— skutočné koncentrácie testovanej chemikálie zachytenej z dýchacej zóny zvierat, v prípade testovaných zmesí, ktoré vytvárajú heterogénne fyzikálne skupenstvá (plyny, pary, aerosóly), možno každé skupenstvo analyzovať samostatne,

— všetky koncentrácie ovzdušia sa zaznamenajú v hmotnostných jednotkách (napr. mg/l, mg/m^3 atď.), v zátvorke možno uviesť aj objemové jednotky (napr. ppm, ppb),

— rozdelenie veľkosti častíc, stredný aerodynamický hmotnostný priemer (MMAD) a štandardná odchýlka geometrického priemeru (σ_g) vrátane metód ich výpočtu. Jednotlivé analýzy veľkosti častíc sa uvedú v správe.

Podmienky testovania:

— podrobné informácie o príprave testovanej chemikálie vrátane podrobných údajov o všetkých postupoch použitých na zmenšenie veľkosti častíc tuhých látok alebo na prípravu roztokov testovanej chemikálie. V prípadoch, v ktorých v dôsledku mechanických procesov mohlo dôjsť k zmene zloženia testovanej chemikálie, sa uvedú výsledky analýzy na overenie zloženia testovanej chemikálie,

— opis (podľa možnosti spolu s nákresom) zariadenia použitého na vytvorenie testovacieho ovzdušia a na expozíciu zvierat testovaciemu ovzdušiu,

— podrobné informácie o použitej chemickej analytickej metóde a o overení metódy (vrátane účinnosti výťažnosti testovanej chemikálie z prostriedku na odber vzorky),

— odôvodnenie výberu testovacích koncentrácií.

Výsledky:

— tabuľkové spracovanie teploty, vlhkosti a prúdenia vzduchu v komore,

— tabuľkové spracovanie údajov o nominálnych a skutočných koncentráciách,

— tabuľkové spracovanie údajov o veľkosti častíc vrátane údajov o odbere vzoriek na analýzu, o rozdelení veľkosti častíc a o výpočtoch MMAD a σ_g,

— tabuľkové spracovanie získaných údajov o reakcii a úrovni koncentrácie pre každé zviera (t. j. zvieratá vykazujúce príznaky toxicity vrátane mortality, charakteru, závažnosti a trvania účinkov),

— telesné hmotnosti jednotlivých zvierat zistené počas dní štúdie, dátum a čas uhynutia, ak k nemu došlo pred plánovaným utratením, časový priebeh nástupu príznakov toxicity a skutočnosť, či tieto príznaky boli reverzibilné pre každé zviera,

▼M4

— pitevné nálezy a histopatologické nálezy pre každé zviera, ak sú k dispozícii,

— klasifikácia kategórie CLP a hraničná hodnota LC_{50}.

Rozbor a interpretácia výsledkov:

— osobitný dôraz sa kladie na opis metód použitých na splnenie kritérií tejto testovacej metódy, napr. limitnej koncentrácie alebo veľkosti častíc,

— dýchateľnosť častíc vzhľadom na celkové zistenia sa uvedie, najmä ak nebolo možné splniť kritériá na veľkosť častíc,

— konzistencia metód použitých na stanovenie nominálnej a skutočnej koncentrácie a vzťah skutočnej koncentrácie k nominálnej koncentrácii sa uvedú v celkovom hodnotení štúdie,

— uvedie sa pravdepodobná príčina uhynutia a prevládajúci druh pôsobenia (systémové či lokálne),

— uvedie sa vysvetlenie, ak bolo potrebné humánnym spôsobom utratiť zvieratá, ktoré mali bolesti alebo vykazovali príznaky silného alebo pretrvávajúceho utrpenia, v súlade s kritériami v usmerňovacom dokumente OECD o humánnych parametroch (Guidance Document on Humane Endpoints) (7).

LITERATÚRA

1. Kapitola B.2 tejto prílohy, Akútna toxicita (inhalačná).

2. Holzhütter, H.-G., Genschow, E., Diener, W., a 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., a Schlede, E. (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol*. 71: 537 – 549.

4. Diener, W., a Schlede, E. (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC50 Tests. *ALTEX* 1: 129 – 134.

5. Kapitola B.1b tejto prílohy, Akútna orálna toxicita — metóda triedy akútnej toxickej.

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, Paríž. K dispozícii na: [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. K dispozícii na: [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, Paríž. K dispozícii na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

9. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006 (Ú. v. EÚ L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼**M4**

10. Kapitola B.40 tejto prílohy, Poleptanie kože *in vitro*: test pomocou transkutánneho elektrického odporu (TER).

11. Kapitola B.40a tejto prílohy, Poleptanie kože *in vitro*: test pomocou modelu ľudskej kože.

12. OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paríž. K dispozícii na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

13. Phalen, R. F. (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (druhé vydanie) 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., a Thiel, A. (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160 – 167

16. OSN (2007), Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemických látok (GHS), ST/SG/AC.10/30, OSN New York a Ženeva. K dispozícii na: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html].

▼**M4**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMU

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M4

Dodatok 2

Postup, ktorý treba dodržať pri každej počiatočnej koncentrácii v prípade plynov (ppm/4 h)

Všeobecné poznámky ([1])

Pri každej počiatočnej koncentrácii príslušné testovacie schémy, ako je uvedené v tejto prílohe, uvádzajú postup, ktorý je potrebné dodržiavať.

Dodatok 2a: Počiatočná koncentrácia je 100 ppm.

Dodatok 2b: Počiatočná koncentrácia je 500 ppm.

Dodatok 2c: Počiatočná koncentrácia je 2 500 ppm.

Dodatok 2d: Počiatočná koncentrácia je 20 000 ppm.

V závislosti od počtu zvierat usmrtených humánnym spôsobom alebo uhynutých sa postup testovania uskutočňuje podľa naznačených šípok.

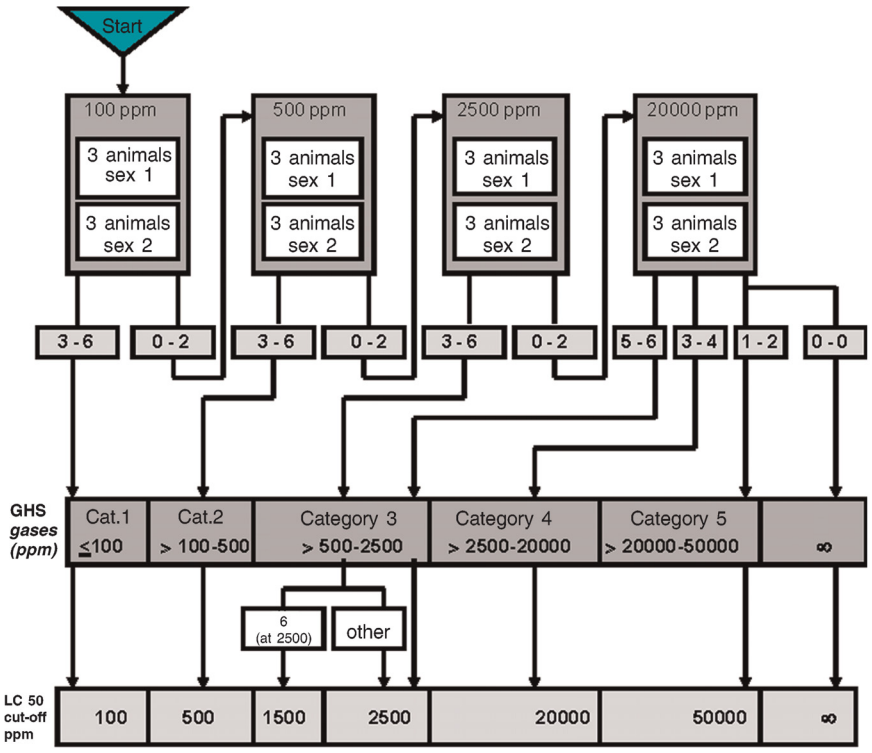
([1]) V týchto tabuľkách je uvedený odkaz na GHS (Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemických látok). Ekvivalentom na úrovni EÚ je nariadenie (ES) č. 1272/2008. V prípade akútnej inhalačnej toxicity nie je v nariadení (ES) č. 1272/2008 (9) zahrnutá kategória 5.

▼M4

Dodatok 2a

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 100 ppm/4 h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

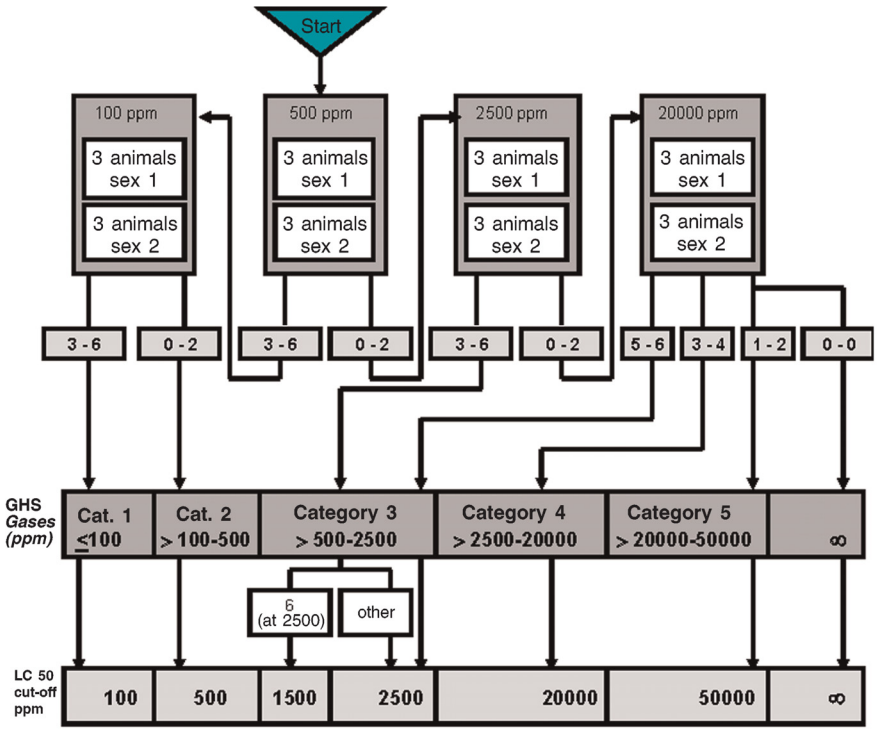
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatok 2b

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 500 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

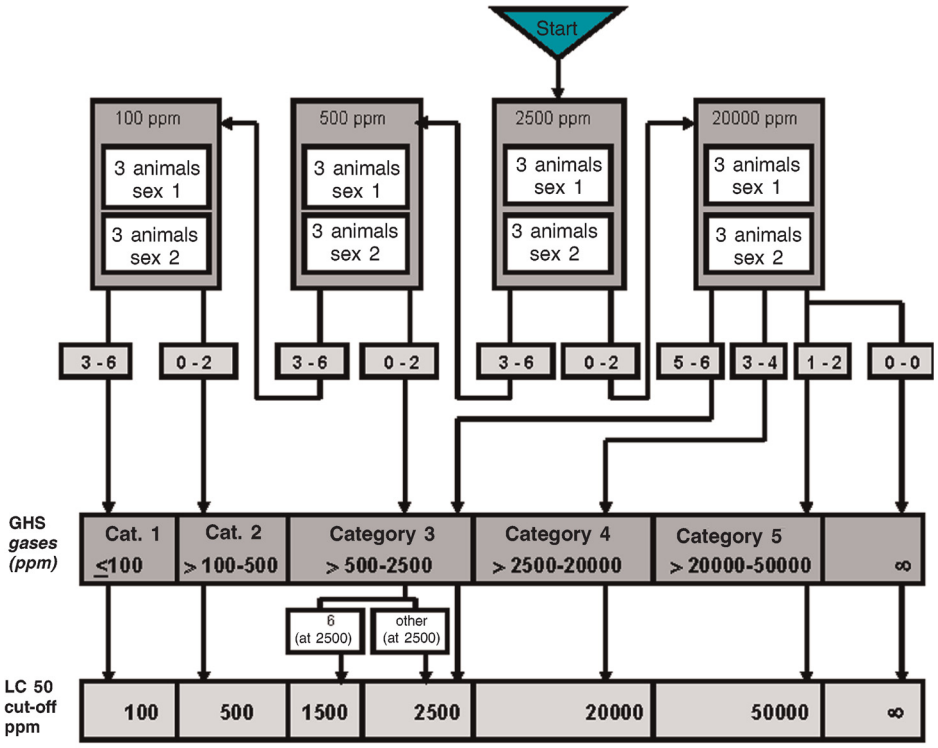
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatok 2c

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 2 500 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

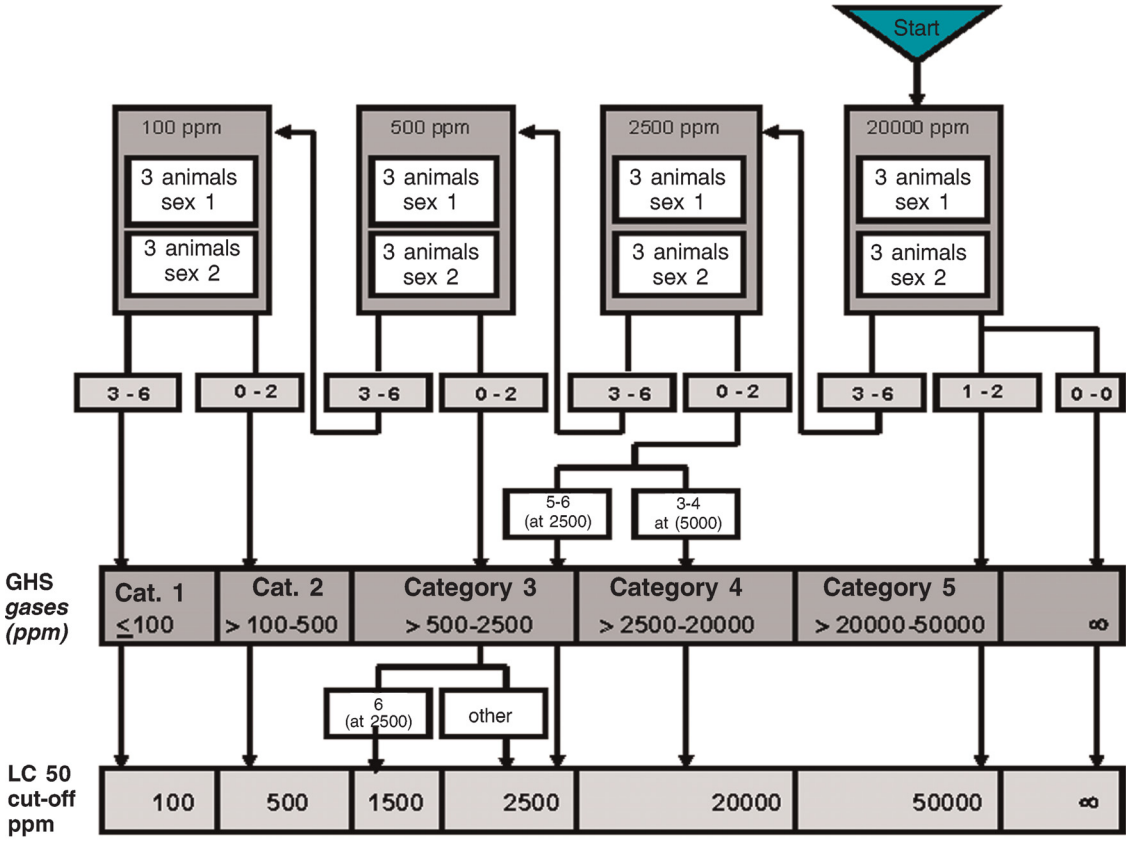
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatok 2d

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 20 000 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼**M4**

Dodatok 3

Postup, ktorý treba dodržať pri každej počiatočnej koncentrácii v prípade pár (mg/L/4 h)

Všeobecné poznámky ([1])

Pri každej počiatočnej koncentrácii príslušné testovacie schémy, ako je uvedené v tejto prílohe, uvádzajú postup, ktorý je potrebné dodržiavať.

Dodatok 3a: Počiatočná koncentrácia je 0,5 mg/l.

Dodatok 3b: Počiatočná koncentrácia je 2,0 mg/l.

Dodatok 3c: Počiatočná koncentrácia je 10 mg/l.

Dodatok 3d: Počiatočná koncentrácia je 20 mg/l.

V závislosti od počtu zvierat usmrtených humánnym spôsobom alebo uhynutých sa postup testovania uskutočňuje podľa naznačených šípok.

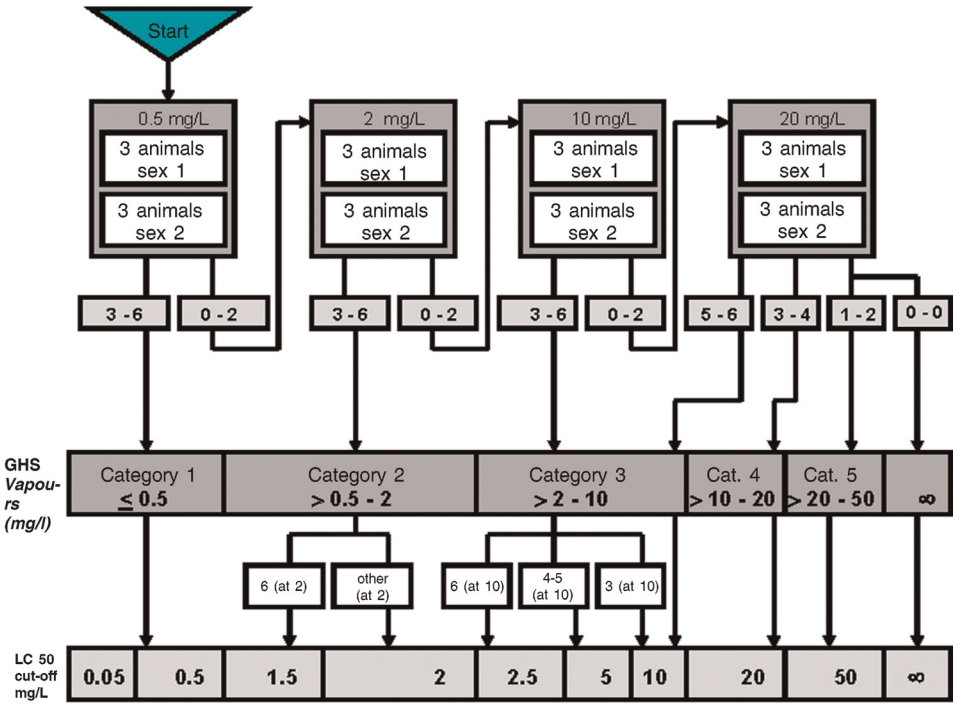
([1]) V týchto tabuľkách je uvedený odkaz na GHS (Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemických látok). Ekvivalentom na úrovni EÚ je nariadenie (ES) č. 1272/2008. V prípade akútnej inhalačnej toxicity nie je v nariadení (ES) č. 1272/2008 (9) zahrnutá kategória 5.

▼M4

Dodatok 3a

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0.5 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

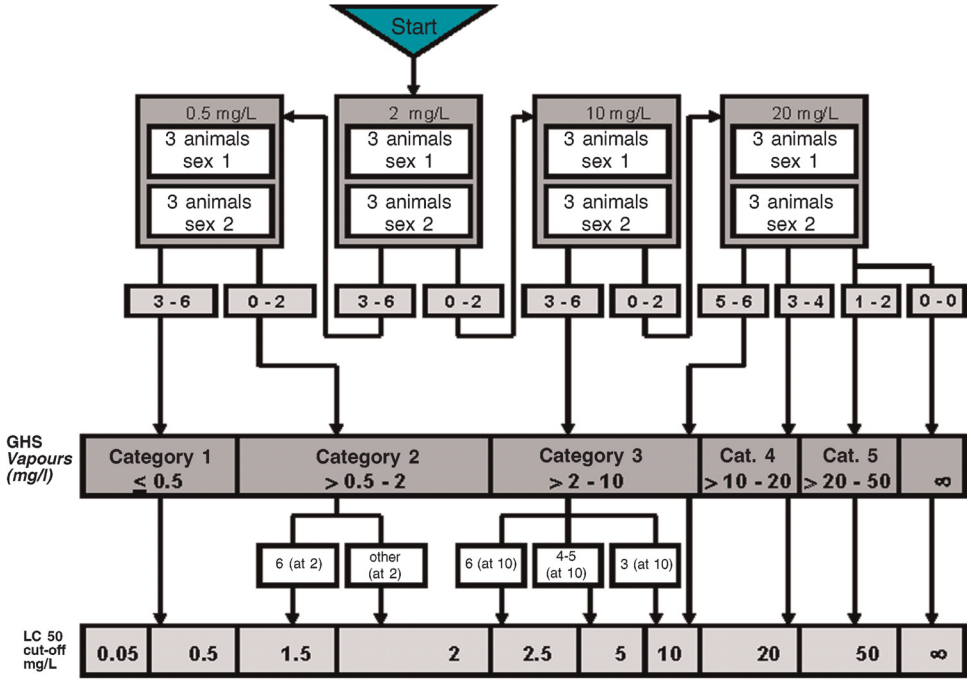
— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatok 3b

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 2 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

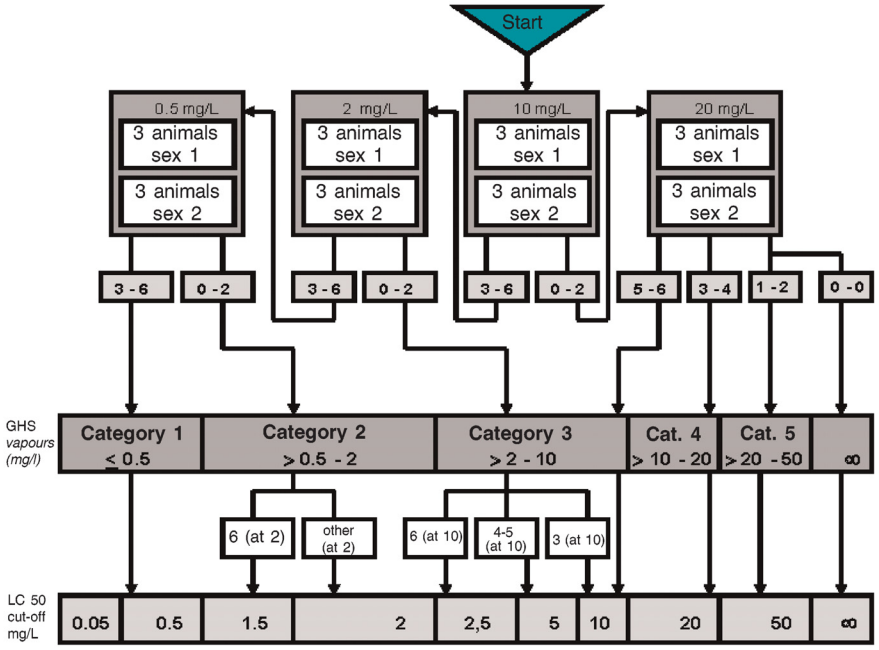
— Testing at 50 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatok 3c

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 10 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used pers step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

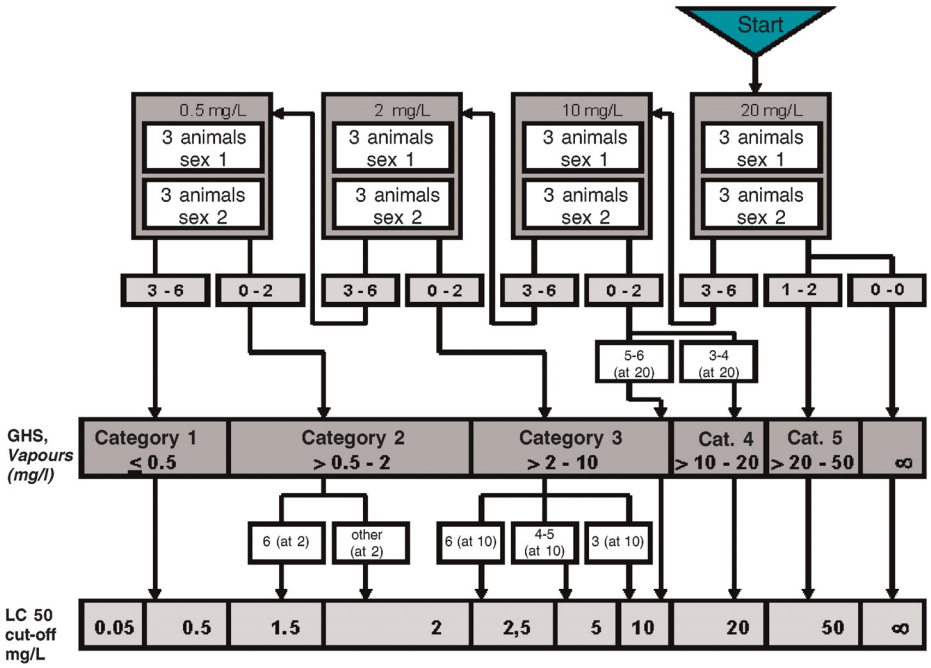
— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatok 3d

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 20 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39(8)

▼M4

Dodatok 4

Postup, ktorý treba dodržať pri každej počiatočnej koncentrácii v prípade aerosólov (mg/L/4 h)

Všeobecné poznámky ([1])

Pri každej počiatočnej koncentrácii príslušné testovacie schémy, ako je uvedené v tejto prílohe, uvádzajú postup, ktorý je potrebné dodržiavať.

Dodatok 4a: Počiatočná koncentrácia je 0,05 mg/l.

Dodatok 4b: Počiatočná koncentrácia je 0,5 mg/l.

Dodatok 4c: Počiatočná koncentrácia je 1 mg/l.

Dodatok 4d: Počiatočná koncentrácia je 5 mg/l.

V závislosti od počtu zvierat usmrtených humánnym spôsobom alebo uhynutých sa postup testovania uskutočňuje podľa naznačených šípok.

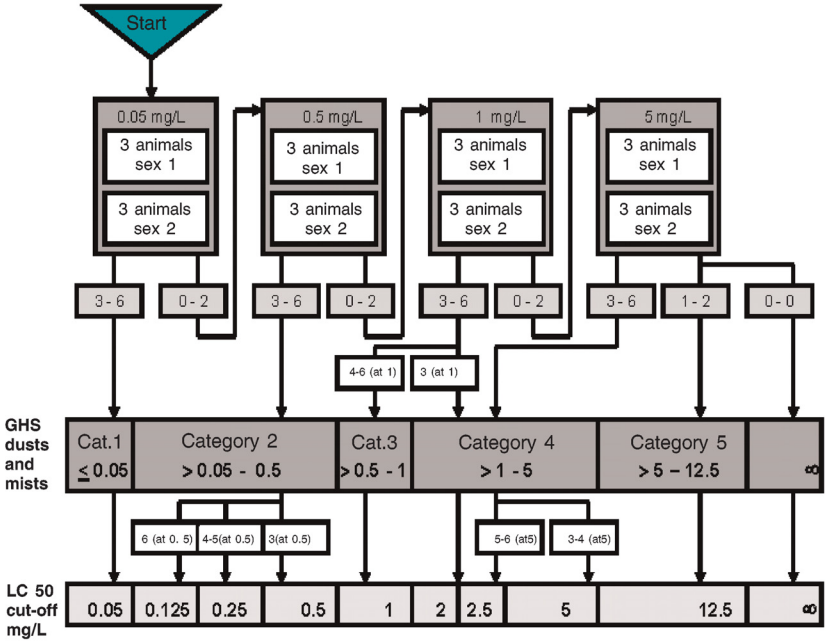
([1]) V týchto tabuľkách je uvedený odkaz na GHS (Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemických látok). Ekvivalentom na úrovni EÚ je nariadenie (ES) č. 1272/2008. V prípade akútnej inhalačnej toxicity nie je v nariadení (ES) č. 1272/2008 (9) zahrnutá kategória 5.

▼M4

Dodatok 4a

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0,05 mg/L/4h for vapours



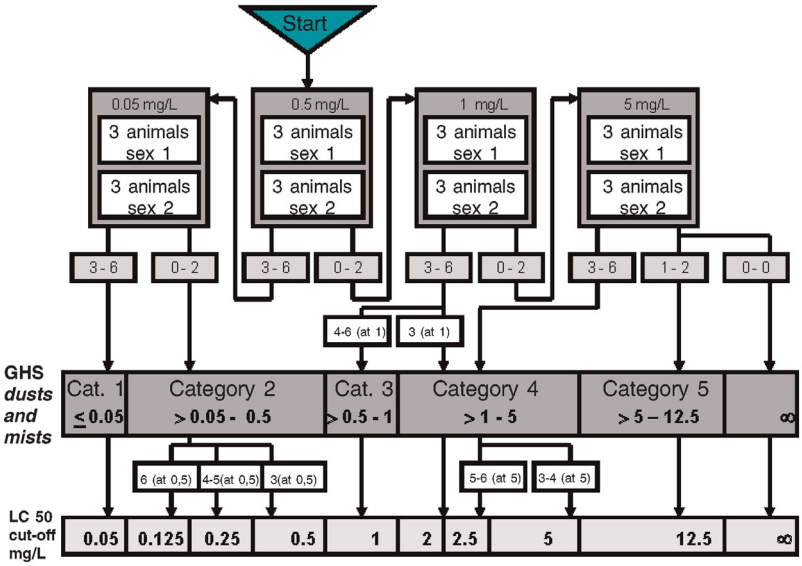
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatok 4b

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0,5 mg/L/4h for aerosols



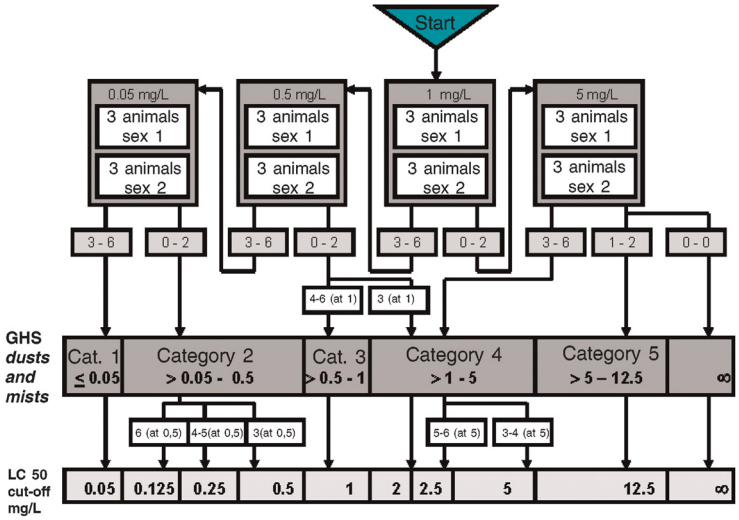
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatok 4c

Acute inhalation toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 1 mg/L/4h for aerosols



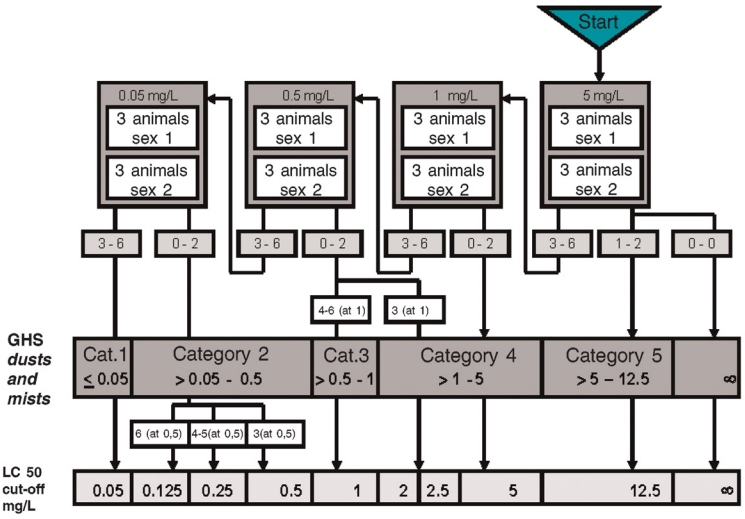
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatok 4d

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 5 mg/L/4h for aerosols



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6 : Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)“

▼M5

B.53. ŠTÚDIA VÝVOJOVEJ NEUROTOXICITY

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmerneniami OECD na vykonávanie testov (TG) 426 (2007). V júni 1995 v Kodani diskutovala pracovná skupina OECD pre reprodukciu a vývojovú toxicitu o potrebe aktualizovať existujúce usmernenia OECD na vykonávanie testov reprodukcie a vývojovej toxicity a o vypracovaní nových usmernení k sledovaným parametrom, ktoré zatiaľ nie sú zahrnuté (1). Pracovná skupina odporučila, aby sa usmernenia na vykonávanie testov vývojovej neurotoxicity vypracovali na základe usmernení US EPA, ktoré boli medzičasom revidované (2). V júni 1996 sa v Kodani uskutočnilo druhé konzultačné stretnutie s cieľom poskytnúť sekretariátu prehľad nových usmernení na vykonávanie testov vývojovej neurotoxicity vrátane hlavných prvkov, napr. podrobností týkajúcich sa výberu druhov zvierat, obdobia dávkovania, obdobia testovania, sledovaných parametrov, ktoré sa majú posudzovať, a kritérií pre hodnotenie výsledkov. Usmernenia USA k posudzovaniu rizika neurotoxicity boli uverejnené v roku 1998 (3). V októbri 2000 sa konalo konzultačné stretnutie odborníkov OECD a v nadväznosti naň seminár Inštitútu ILSI pre vedecké riziká (ILSI Risk Science Institute) a v roku 2005 konzultačné stretnutie odborníkov v Tokiu. Tieto stretnutia sa uskutočnili s cieľom prediskutovať vedecké a technické otázky týkajúce sa súčasných usmernení na vykonávanie testov a odporúčania zo stretnutí (4)(5)(6)(7) sa zohľadnili pri vypracúvaní tejto testovacej metódy. Ďalšie informácie o realizácii, interpretácii a použitej terminológii v súvislosti s touto testovacou metódou sú k dispozícii v usmerňovacom dokumente OECD č. 43 o „testovaní a hodnotení reprodukčnej toxicity“ (8) a v usmerňovacom dokumente č. 20 o „testovaní neurotoxicity“ (9).

ÚVODNÉ ÚVAHY

2. O mnohých chemikáliách je známe, že majú vývojové neurotoxické účinky na ľudí a iné živočíšne druhy (10)(11)(12)(13). Na posúdenie a hodnotenie toxických vlastností chemikálie môže byť potrebné určiť potenciál vývojovej neurotoxicity. Štúdie vývojovej neurotoxicity sú určené na získanie údajov, medzi ktoré patrí aj charakterizácia vzťahu medzi dávkou a reakciou, o potenciálnych funkčných a morfologických účinkoch na vyvíjajúcu sa nervovú sústavu mláďat, ktoré môžu súvisieť s expozíciou v utere a v ranom vývojovom štádiu.

3. Štúdiu vývojovej neurotoxicity možno vykonať ako samostatnú štúdiu, zahrnutú do štúdie reprodukčnej toxicity a/alebo štúdie neurotoxicity u dospelých jedincov (napr. testovacie metódy B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)) alebo ju priložiť k štúdii prenatálnej vývojovej toxicity (napr. testovacia metóda B.31 (17)). Ak je štúdia vývojovej neurotoxicity zahrnutá do inej štúdie, alebo je k nej priložená, je nevyhnutné zachovať integritu oboch typov štúdií. Všetky testy by mali byť v súlade s príslušnými právnymi predpismi alebo vládnymi a inštitucionálnymi usmerneniami pre používanie laboratórnych zvierat vo výskume (napr. 18).

4. Testovacie laboratórium by malo posúdiť všetky dostupné informácie o testovanej chemikálii pred uskutočnením štúdie. Tieto informácie zahŕňajú identitu a štruktúru chemikálie, jej fyzikálno-chemické vlastnosti, výsledky všetkých ostatných in vitro alebo in vivo testov toxicity s chemikáliou, toxikologické údaje o štrukturálne príbuzných chemikáliách a predpokladané použitie(-ia) chemikálie. Tieto informácie sú potrebné, aby sa zainteresované strany presvedčili, že test má význam pre ochranu zdravia ľudí a pomôže pri výbere vhodnej počiatočnej dávky.

▼M5

PRINCÍP TESTU

5. Testovaná chemikália sa podá zvieratám počas gravidity a laktácie. Účelom testovania matiek je posúdiť účinky u gravidných samíc a samíc v laktácii, pričom tieto testy môžu priniesť aj komparatívne informácie (matky v porovnaní s mláďatami). Mláďatá sa na účely hodnotenia neurotoxicity vyberú z vrhov náhodne. Hodnotenie pozostáva z pozorovaní s cieľom odhaliť makroskopické neurologické abnormality a poruchy správania vrátane posúdenia fyzického vývinu, behaviorálnej ontogenézy, motorickej aktivity, motorických a zmyslových funkcií, učenia a pamäte, ako aj posúdenia hmotnosti mozgu a neuropatológie počas postnatálneho vývinu a dospelosti.

6. Ak sa testovacia metóda vykonáva ako samostatná štúdia, možno ďalšie dostupné zvieratá v každej skupine použiť na špecifické neurobehaviorálne, neuropatologické, neurochemické alebo elektrofyziologické postupy, ktoré môžu doplniť údaje získané z vyšetrení odporúčaných podľa tejto testovacej metódy (16)(19)(20)(21). Dodatočné postupy môžu byť mimoriadne užitočné, keď empirické pozorovania, očakávané účinky alebo mechanizmus/pôsobenie indikujú špecifický typ neurotoxicity. Tieto dodatočné postupy možno použiť v prípade matiek, ako aj mláďat. Okrem toho možno použiť aj postupy ex vivo alebo in vitro, pokiaľ tieto postupy nenarúšajú integritu postupov in vivo.

PRÍPRAVY NA TEST

Výber druhov zvierat

7. Uprednostňovaným druhom zvierat sú potkany, ak je to vhodné, môžu sa použiť aj iné druhy. Majte však na pamäti, že gestačné a postnatálne dni uvedené v tejto testovacej metóde sú špecifické pre bežne používané kmene potkanov a ak sa použije iný druh alebo menej bežný kmeň, mali by sa zvoliť porovnateľné dni. Použitie iného druhu je potrebné odôvodniť na základe toxikologických, farmakokinetických a/alebo iných údajov. V odôvodnení sa uvedie dostupnosť druhovo špecifických postnatálnych neurobehaviorálnych a neuropatologických hodnotení. Ak sa predtým uskutočnil test, ktorý viedol k obavám, mal by sa zvážiť druh/kmeň, ktorý tieto obavy vyvolal. Vzhľadom na rozdielne vlastnosti rôznych kmeňov potkanov by mali byť k dispozícii dôkazy, že vybraný kmeň, ktorý sa použije, má zodpovedajúcu plodnosť a vnímavosť. Na účely zistenia vývojovej neurotoxicity je potrebné zdokumentovať spoľahlivosť a citlivosť ostatných druhov.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

8. Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 ± 3 °C. Hoci relatívna vlhkosť by mala byť najmenej 30 % a podľa možnosti by nemala presiahnuť 70 %, okrem času čistenia miestnosti, cieľom by mala byť 50 – 60 % vlhkosť. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Takisto možno obrátiť svetelný cyklus pred párením a po celú dobu štúdie s cieľom posúdiť funkčné a behaviorálne sledované parametre počas obdobia tmy (pri červenom svetle), t. j. v čase, keď sú zvieratá zvyčajne aktívne (22). Akékoľvek zmeny cyklu striedania svetla a tmy by mali zahŕňať primeraný čas na aklimatizáciu, aby sa zvieratá mohli prispôsobiť novému cyklu. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Druh krmiva a vody by sa mal uviesť do správy a krmivo aj voda sa analyzujú s cieľom zistiť, či neobsahujú kontaminanty.

▼M5

9. Zvieratá môžu byť umiestnené jednotlivo alebo v malých skupinách rovnakého pohlavia v klietkach. Párenie sa uskutoční v klietkach, ktoré sú vhodné na tento účel. Po spárení alebo najneskôr do 15. dňa gravidity sa spárené zvieratá umiestnia do samostatných klietok určených na vrh alebo pre matky. Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy vzhľadom na ich umiestnenie. Krátko pred termínom vrhu sa spáreným samiciam poskytne vhodný a vymedzený hniezdiaci materiál. Je všeobecne známe, že nesprávne zaobchádzanie alebo stres počas gravidity môže viesť k nežiaducim následkom, napríklad k prenatálnej strate alebo k zmene fetálneho alebo postnatálneho vývinu. Aby sa zabránilo strate plodu v dôsledku faktorov, ktoré nesúvisia so zaobchádzaním, malo by sa so zvieratami počas gravidity zaobchádzať starostlivo a nemali by sa vystavovať stresu v dôsledku vonkajších faktorov, akým je napr. nadmerný hluk zvonka.

Príprava zvierat

10. Mali by sa použiť zdravé zvieratá, ktoré sa aklimatizovali v laboratórnych podmienkach a neboli predmetom predchádzajúcich experimentálnych postupov, pokiaľ daná štúdia nie je zahrnutá do inej štúdie (pozri odsek 3). Pokusné zvieratá sa charakterizujú na základe druhu, kmeňa, zdroja, pohlavia, hmotnosti a veku. Každému zvieraťu sa pridelí jedinečné identifikačné číslo, ktorým sa zviera označí. Zvieratá vo všetkých pokusných skupinách by podľa možnosti mali mať tú istú hmotnosť a vek a mali by byť v obvyklom rozsahu druhu a kmeňa, ktorý je predmetom štúdie. Na každú veľkosť dávky sa použijú mladé dospelé, panenské samice. Súrodenci by sa nemali páriť a treba dôkladne dbať na to, aby sa zabezpečilo, že sa nespária. Deň gravidity 0 je deň, keď sa pozoruje vaginálna zátka a/alebo spermie. Pri kupovaní zvierat od dodávateľa, ktoré sú podľa časových údajov gravidné, by sa im mala umožniť primeraná doba na aklimatizáciu (napr. 2 – 3 dni). Spárené samice sa náhodne rozdelia do kontrolných a ošetrovaných skupín a podľa možnosti sa do týchto skupín rozdelia rovnomerne (na zabezpečenie rovnomerného rozdelenia medzi všetky skupiny sa odporúča napr. stratifikovaný náhodný postup, ako je rozdelenie na základe na telesnej hmotnosti). Samice oplodnené rovnakým samcom sa rovnomerne rozdelia do skupín.

POSTUP

Počet a pohlavie zvierat

11. Každá pokusná a kontrolná skupina by mala obsahovať dostatočný počet gravidných samíc, ktoré budú vystavené testovanej chemikálii, aby sa zabezpečil dostatočne veľký počet mláďat na účely hodnotenia neurotoxicity. Pre každú úroveň dávky sa odporúča celkom 20 vrhov. Duplicitné dávkovanie a dávkovanie rozložené do skupín je povolené, ak sa dosiahne celkový počet vrhov na skupinu, a v prípade replikátov sa použijú primerané štatistické modely.

12. Na 4. postnatálny deň (4. PND) alebo skôr (deň pôrodu je 0. PND) sa veľkosť každého vrhu upraví tak, že mláďatá navyše sa náhodne odoberú, aby sa zabezpečila jednotná veľkosť vrhu v prípade všetkých vrhov (23). Veľkosť vrhu by nemala prekročiť priemernú veľkosť vrhu kmeňa použitých hlodavcov (8 – 12). Vo vrhu by sa mal podľa možnosti nachádzať rovnaký počet samčích a samičích mláďat. Selektívne odstránenie mláďat, napr. na základe telesnej hmotnosti, nie je vhodné. Po štandardizácii vrhov (utratení) a pred ďalším testovaním funkčných sledovaných parametrov sa jednotlivé mláďatá, ktoré sa majú testovať pred odstavením alebo po odstavení od matky, jednoznačne identifikujú s využitím akejkoľvek vhodnej humánnej metódy na identifikáciu mláďat (napr. 24).

▼M5

Zaradenie zvierat na funkčné a behaviorálne testy, váženie mozgu a neuropatologické hodnotenia

13. Táto testovacia metóda umožňuje rôzne prístupy, pokiaľ ide o zaradenie zvierat vystavených chemikálii v utere a prostredníctvom laktácie na funkčné a behaviorálne testy, určenie pohlavnej zrelosti, hmotnosti mozgu a neuropatologické hodnotenie (25). Ďalšie testy neurobehaviorálnych funkcií (napr. sociálneho správania), neurochémie alebo neuropatológie možno pridať v závislosti od jednotlivých prípadov, pokiaľ sa tým nenaruší integrita pôvodných požadovaných testov.

14. Z každej dávkovej skupiny sa na 4. postnatálny deň alebo neskôr vyberú mláďatá a priradia sa na účely hodnotení sledovaných parametrov. Mláďatá by sa mali vybrať tak, aby boli v prípade všetkých testov podľa možnosti z každého vrhu v každej dávkovej skupine rovnako zastúpené obe pohlavia. Na účely testovania motorickej aktivity sa testuje rovnaký pár samčích a samičích mláďat všetkých vekových skupín pred odstavením od matky (pozri odsek 35). Pri všetkých ostatných testoch sa rovnaké alebo samostatné páry samcov a samíc môžu priradiť na rôzne behaviorálne testy. Na účely testovania kognitívnych funkcií odstavených mláďat v porovnaní s dospelými jedincami môže byť potrebné priradiť rôzne mláďatá, aby sa predišlo chybnej interpretácii v dôsledku veku zvierat a predchádzajúcich skúseností s týmito meraniami (26)(27). Pri odstavení od matky (21. postnatálny deň) sa mláďatá, ktoré neboli vybrané na testovanie, humánnym spôsobom utratia. Akékoľvek zmeny v zaradení mláďat sa uvedú do správy. Štatistická merná jednotka je vrh (alebo matka), nie mláďa.

15. Existujú rôzne spôsoby, ako priradiť mláďatá na účely vyšetrení pred odstavením a po odstavení od matky, kognitívnych testov, patologických vyšetrení atď. (všeobecná schéma je uvedená na obrázku 1 a príklady priradenia v dodatku 1). Odporúčaný minimálny počet zvierat v každej dávkovej skupine na účely vyšetrení pred odstavením a po odstavení od matky je tento:

Klinické vyšetrenia a telesná hmotnosť	Všetky zvieratá
Podrobné klinické vyšetrenia	20/pohlavie (1/pohlavie/vrh)
Hmotnosť mozgu (po fixácii) 11. – 22. PND	10/pohlavie (1/vrh)
Hmotnosť mozgu (bez fixácie) ~ 70. PND	10/pohlavie (1/vrh)
Neuropatológia (fixácia ponorením alebo perfúziou) 11 – 22. PND	10/pohlavie (1/vrh)
Neuropatológia (fixácia perfúziou) ~ 70. PND	10/pohlavie (1/vrh)
Pohlavná zrelosť	20/pohlavie (1/pohlavie/vrh)
Iné vývojové medzníky (nepovinné)	Všetky zvieratá
Behaviorálna ontogenéza	20/pohlavie (1/pohlavie/vrh)
Motorická aktivita	20/pohlavie (1/pohlavie/vrh)
Motorické a zmyslové funkcie	20/pohlavie (1/pohlavie/vrh)
Učenie a pamäť	10/pohlavie ([a]) (1/vrh)

([a]) V závislosti od citlivosti testov kognitívnych funkcií by sa malo zvážiť vyšetrenie oveľa väčšieho počtu zvierat, napr. 1 samca a 1 samice z každého vrhu (priraďovanie zvierat je uvedené v dodatku 1) (ďalšie usmernenia o veľkosti vzorky sa uvádzajú v usmerňovacom dokumente OECD č. 43 (8)).

▼M5

Dávkovanie

16. Použijú sa aspoň tri veľkosti dávok a uskutoční sa paralelná kontrola. Dávky sa rozložia tak, aby sa toxické účinky zvyšovali. Ak tomu nebráni fyzikálno-chemický charakter alebo biologické vlastnosti chemikálie, zvolí sa najvyššia úroveň dávky s cieľom vyvolať určitú toxicitu u matiek (napr. klinické príznaky, zníženie prírastku telesnej hmotnosti (nie viac ako 10 %) a/alebo známky toxicity limitnej dávky v cieľovom orgáne). Vysoká dávka môže byť až na niektoré výnimky limitovaná na 1000 mg/kg/deň telesnej hmotnosti. Napríklad očakávaná expozícia ľudí môže indikovať, že je potrebné použiť vyššiu úroveň dávkovania. Prípadne možno vykonať pilotné štúdie alebo prípravné štúdie na zistenie rozsahu najvyššej dávky, ktorá by mala vyvolať minimálnu úroveň toxicity u matiek. Ak štandardná štúdia vývojovej toxicity alebo pilotná štúdia preukáže, že testovaná chemikália spôsobuje vývojovú toxicitu, najvyššia dávka by mala byť maximálna úroveň dávky, ktorá nespôsobí nadmernú toxicitu u mláďat alebo v utere, smrť alebo malformácie plodu v takom rozsahu, ktorý znemožní zmysluplné hodnotenie neurotoxicity. Najnižšia úroveň dávky by mala byť taká, aby nevyvolala žiadne príznaky toxicity u matiek alebo vývojovej toxicity vrátane neurotoxicity. Klesajúca postupnosť dávok sa zvolí tak, aby sa preukázala každá reakcia súvisiaca s dávkou a hladina bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL), alebo sa použijú dávky blízko detekčného limitu, ktorý by umožnil stanoviť referenčnú dávku. Dvojnásobné až štvornásobné intervaly sú často optimálne na stanovenie klesajúceho dávkovania a pridanie štvrtej dávkovej skupiny je často vhodnejšie ako používanie veľmi veľkých intervalov (napr. viac ako faktor 10) medzi dávkami.

17. Pri výbere úrovní dávok sa zohľadnia všetky existujúce údaje o toxicite, ako aj ďalšie informácie o metabolizme a toxikokinetike testovanej chemikálie alebo príbuzných materiálov. Tieto informácie môžu pomôcť aj pri preukazovaní vhodnosti režimu dávkovania. Priame dávkovanie u mláďat by sa malo zvážiť z hľadiska expozície a farmakokinetických informácií (28)(29). Pred vykonaním štúdií s priamym dávkovaním by sa mali dôkladne posúdiť všetky výhody a nevýhody (30).

18. Súbežnou kontrolnou skupinou je zdanlivo ošetrovaná kontrolná skupina alebo kontrolná skupina, ktorej sa podáva nosič, ak sa pri podávaní testovanej chemikálie používa nosič. Všetkým zvieratám sa bežne podá rovnaké množstvo testovanej chemikálie alebo nosiča podľa telesnej hmotnosti. Ak sa použije nosič alebo iné aditívum na uľahčenie dávkovania, je potrebné zvážiť tieto vlastnosti: vplyv na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo zadržiavanie testovanej chemikálie, účinky na chemické vlastnosti testovanej chemikálie, ktoré môžu zmeniť svoje toxické vlastnosti, vplyv na spotrebu potravy a vody alebo na stav výživy zvierat. Nosič by nemal mať účinky, ktoré by mohli mať vplyv na interpretáciu štúdie, nemal by mať neurobehaviorálne toxické účinky ani účinky na reprodukciu alebo vývoj. U nových nosičov sa okrem kontrolnej skupiny nosiča použije zdanlivo ošetrovaná kontrolná skupina. So zvieratami v kontrolnej(-ých) skupine(-ách) sa zaobchádza rovnakým spôsobom ako so zvieratami v pokusných skupinách.

▼M5

Podávanie dávok

19. Testovaná chemikália alebo nosič sa podá spôsobom, ktorý je najrelevantnejší pre potenciálnu expozíciu na ľudí, a na základe dostupných informácií o metabolizme a distribúcii u pokusných zvierat. Spôsob podávania bude vo všeobecnosti orálny (napr. sondou, v krmive, v pitnej vode), ale možno použiť aj iné spôsoby (napr. dermálnou aplikáciou, inhaláciou) v závislosti od vlastností a očakávaných alebo známych spôsobov expozície na ľudí (ďalšie usmernenia sú k dispozícii v usmerňovacom dokumente č. 43 (8)). Výber spôsobu podávania je potrebné odôvodniť. Testovaná chemikália sa podáva každý deň približne v rovnakom čase.

20. Dávka podávaná každému zvieraťu sa zvyčajne zakladá na naposledy zistenej telesnej hmotnosti. Osobitnú pozornosť je však potrebné venovať nastavovaniu dávok počas posledného trimestra gravidity. Ak sa zaznamená nadmerná toxicita u ošetrených matiek, tieto zvieratá sa humánnym spôsobom usmrtia.

21. Testovaná chemikália alebo nosič sa podáva minimálne raz denne spáreným samiciam od okamihu implantácie (6. deň gravidity) a počas laktácie (21. postnatálny deň), aby boli mláďatá vystavené testovanej chemikálii počas prenatálneho a postnatálneho neurologického vývoja. Vek, v ktorom sa začínajú podávať dávky, trvanie a frekvencia dávkovania možno upraviť, ak sa preukáže, že takéto pokusné usporiadanie má pre expozíciu na ľudí väčší význam. Trvanie dávkovania sa pre ostatné druhy upraví tak, aby sa zabezpečila expozícia počas počiatočných fáz vývoja mozgu (t. j. fáz zodpovedajúcich prenatálnemu a počiatočnému postnatálnemu vývoju ľudského mozgu). S dávkovaním sa môže začať od začiatku gravidity (0. deň gravidity), hoci je potrebné zvážiť potenciál testovanej chemikálie spôsobiť predimplantačnú stratu. Podávaním od 6. dňa gravidity sa tomuto riziku zabráni, nezohľadnia sa však vývojové štádiá medzi 0. a 6. dňom gravidity. Ak laboratórium nakúpi zvieratá spárené na základe časových údajov, nie je praktické začať s dávkovaním na 0. deň gravidity a je vhodné začať s ním na 6. deň gravidity. Pokusné laboratórium by malo stanoviť režim dávkovania na základe relevantných informácií o účinkoch testovanej chemikálie, predchádzajúcich skúseností a logistických aspektov, ktoré môžu viesť k predĺženiu dávkovania na obdobie, keď sa mláďa odstaví od matky. Dávka by sa v deň pôrodu nemala podať tým zvieratám, ktoré ešte nevrhli všetky svoje mláďatá. Vo všeobecnosti sa predpokladá, že k expozícii mláďat dôjde prostredníctvom materského mlieka, priame dávkovanie u mláďat by sa však malo zvážiť v tých prípadoch, keď nemožno preukázať nepretržitú expozíciu mláďat. Dôkazy o nepretržitej expozícii možno získať napr. z farmakokinetických informácií, na základe toxicity u mláďat alebo zmien biomarkerov (28).

POZOROVANIA

Pozorovania u matiek

22. Všetky matky sa dôkladne pozorujú najmenej raz denne, a to s ohľadom na ich zdravotný stav vrátane chorobnosti a úmrtnosti.

23. Počas ošetrovania a pozorovania by sa mali pravidelne vykonávať podrobnejšie klinické vyšetrenia (najmenej dvakrát počas dávkovania v období gravidity a dvakrát počas dávkovania v období laktácie) najmenej u desiatich matiek pri každej úrovni dávkovania. Zvieratá mimo domácej klietky pozorujú školení technici, ktorí nie sú informovaní, akým spôsobom boli zvieratá ošetrené, a to s využitím štandardizovaných postupov, aby sa minimalizoval stres u zvierat a zaujatosť pozorovateľa a maximalizovala sa spoľahlivosť pozorovateľa. Odporúča sa, aby vyšetrovania v danej štúdii podľa možnosti vykonával ten istý technik.

▼M5

24. Pozorované príznaky sa zaznamenajú. Vždy, keď je to možné, zaznamená sa aj závažnosť pozorovaných príznakov. Klinicky sa pozorujú okrem iného zmeny na koži, srsti, očiach, slizniciach, výskyt sekrétov a autonómna aktivita (napr. slzenie, zježenie, veľkosť zreničky, nezvyčajný priebeh dýchania a/alebo dýchanie ústami, všetky nezvyčajné príznaky pri močení alebo vyprázdňovaní).

25. Všetky nezvyčajné reakcie, pokiaľ ide o polohu tela, stupeň aktivity (napr. zvýšený alebo znížený záujem o preskúmanie zvyčajného priestoru) a koordinácia pohybu, sa tiež zaznamenajú. Zmeny chôdze (napr. tackavá chôdza, ataxia), poloha (napr. zhrbená) a reaktivita na zaobchádzanie, premiestnenie alebo iné podnety z prostredia, ako aj výskyt klonických alebo tonických pohybov, kŕče, triaška, stereotypy (napr. nadmerná starostlivosť o srsť, nezvyčajné pohyby hlavou, opakovaný beh dokola), zvláštne správanie (napr. hryzenie alebo nadmerné olizovanie, sebamrzačenie, chôdza dozadu, vydávanie zvukov) alebo agresia sa zaznamenajú.

26. Zaznamenajú sa príznaky toxicity vrátane dňa nástupu, dennej doby, stupňa a trvania.

27. Zvieratá sa v období dávkovania v priebehu štúdie vážia najmenej raz týždenne alebo v deň pôrodu či krátko pred ním a na 21. postnatálny deň (odstavenie od matky). V prípade štúdií, v ktorých sa chemikália podáva sondou, sa matky vážia najmenej dvakrát týždenne. Dávky sa pri každom stanovení telesnej hmotnosti podľa potreby upravia. Spotreba potravy sa meria každý týždeň prinajmenšom v období gravidity a laktácie. V prípade expozície prostredníctvom vody sa aspoň raz týždenne meria spotreba vody.

Pozorovania u mláďat

28. Všetky mláďatá sa dôkladne pozorujú najmenej raz denne, a to s ohľadom na známky toxicity, chorobnosť a úmrtnosť.

29. Počas ošetrovania a pozorovania by sa u mláďat mali pravidelne vykonávať podrobnejšie klinické vyšetrenia. Mláďatá (aspoň jedno mláďa z každého pohlavia z každého vrhu) pozorujú školení technici, ktorí nie sú informovaní, akým spôsobom boli zvieratá ošetrené, a to s využitím štandardizovaných postupov, aby sa minimalizovala zaujatosť pozorovateľa a maximalizovala sa jeho spoľahlivosť. Odporúča sa, aby vyšetrovania podľa možnosti vykonával ten istý technik. Podľa potreby sa monitorujú prinajmenšom sledované parametre opísané v odsekoch 24 a 25 s ohľadom na pozorované vývojové štádium.

30. Zaznamenajú sa všetky príznaky toxicity u mláďat vrátane dňa nástupu, dennej doby, stupňa a trvania.

Fyzické a vývojové medzníky

31. Zmeny vývojových medzníkov pred odstavením (napr. odlepovanie ušných boltcov, otváranie očí, prerezávanie hryzákov) majú vysokú koreláciu s telesnou hmotnosťou (30)(31). Telesná hmotnosť môže byť najlepším ukazovateľom telesného vývoja. Meranie vývojových medzníkov sa preto odporúča iba vtedy, ak sa predtým preukázalo, že tieto sledované parametre prinesú ďalšie informácie. Časový harmonogram pre hodnotenie týchto parametrov je uvedený v tabuľke 1. V závislosti od očakávaných účinkov a výsledkov počiatočných meraní môže byť vhodné pridať ďalšie časy alebo vykonať merania v iných vývojových štádiách.

▼M5

32. Pri posudzovaní telesného vývoja sa namiesto postnatálneho veku odporúča použiť postkoitálny vek (33). Ak sa mláďatá testujú v deň odstavenia od matky, odporúča sa, aby sa toto testovanie vykonalo pred samotným odstavením, aby sa predišlo chybnej interpretácii v dôsledku stresu spojeného s odstavením. Okrem toho dva dni po odstavení by sa mláďatá nemali podrobovať žiadnemu testovaniu.

Tabuľka 1

Časový harmonogram hodnotenia telesných a vývojových medzníkov a funkčné/behaviorálne sledované parametre ([a])

Vekové obdobie / Sledované parametre	Pred odstavením ([b])	Dospievanie ([b])	Mladé dospelé jedince ([b])
Fyzické a vývojové medzníky			
Telesná hmotnosť a klinické vyšetrenia	každý týždeň ([c])	aspoň každé dva týždne	aspoň každé dva týždne
Hmotnosť mozgu	22. PND ([d])		pri ukončení
Neuropatológia	22. PND ([d])		pri ukončení
Pohlavná zrelosť	—	podľa potreby	—
Iné vývojové medzníky ([e])	podľa potreby	—	—
Funkčné/behaviorálne sledované parametre			
Behaviorálna ontogenéza	Aspoň dve merania		
Motorická aktivita (vrátane návykov)	1 -3 razy ([f])	—	raz
Motorické a zmyslové funkcie	—	raz	raz
Učenie a pamäť	—	raz	raz

([a]) V tejto tabuľke sa uvádza minimálny počet meraní. V závislosti od očakávaných účinkov a výsledkov počiatočných meraní môže byť vhodné pridať ďalšie časy (napr. u zvierat vo vysokom veku) alebo vykonať merania v iných vývojových štádiách.

([b]) Odporúča sa, aby sa mláďatá netestovali počas dvoch dní po odstavení od matky (pozri odsek 32). Odporúčaný vek pre testovanie dospievajúcich jedincov je: na učenie a pamäť = 25. PND (± 2 dni); na motorické a zmyslové funkcie = 25. PND (± 2 dni). Odporúčaný vek pre testovanie mladých dospelých jedincov je 60 -70 PND.

([c]) Telesná hmotnosť by sa v prípade priameho dávkovania u mláďat mala merať aspoň dvakrát týždenne na účely úpravy dávky v období prudkého prírastku telesnej hmotnosti.

([d]) Hmotnosť mozgu a neuropatológiu možno hodnotiť skôr (napr. na 11. PND), ak je to vhodné (pozri odsek 39).

([e]) Okrem telesnej hmotnosti sa podľa potreby zaznamenajú aj ďalšie vývojové medzníky (napr. otvorenie očí) (pozri odsek 31).

([f]) Pozri odsek 35.

33. Určí sa počet a pohlavie živých mláďat, napr. vizuálnou kontrolou alebo zmeraním anogenitálnej vzdialenosti (34)(35), a každé mláďa v rámci vrhu sa jednotlivo odváži pri narodení alebo krátko po ňom, aspoň raz týždenne počas laktácie a potom aspoň raz za dva týždne. Pri hodnotení pohlavnej zrelosti sa určí vek a telesná hmotnosť aspoň jedného samca a jednej samice z každého vrhu v čase, keď sa u nich pozoruje vaginálna priechodnosť (36) alebo oddelenie predkožky (37).

▼M5

Behaviorálna ontogenéza

34. Ontogenéza vybraného správania sa meria aspoň u jedného mláďaťa z každého pohlavia z každého vrhu v príslušnom vekovom období, pričom na hodnotenie každého správania sa počas všetkých dní testovania použijú tie isté mláďatá. Medzi dňami merania by mali byť počas tohto obdobia rovnomerné odstupy, aby sa určila buď normálna zmena v ontogenéze daného správania, alebo zmena v ontogenéze daného správania súvisiaca s ošetrením (38). Medzi príklady správania, u ktorých možno hodnotiť ich ontogenézu, patrí: reflex rovnováhy, negatívna geotaxia a motorická aktivita (38)(39)(40).

Motorická aktivita

35. Motorická aktivita sa monitoruje (41)(42)(43)(44)(45) v období pred odstavením od matky a počas dospelosti. Informácie o testovaní v čase odstavenia od matky sa uvádzajú v odseku 32. Testy by mali trvať dostatočne dlho, aby sa počas testovania u neošetrených kontrolných skupín prejavili návyky. Na hodnotenie behaviorálnej ontogenézy sa dôrazne odporúča použitie motorickej aktivity. Ak sa motorická aktivita použije ako test behaviorálnej ontogenézy, potom sa v rámci testovania pri všetkých skúškach pred odstavením od matky použijú tie isté zvieratá. Testovania by mali prebiehať dostatočne často, aby bolo možné posúdiť ontogenézu návykov počas testu (44). Na tento účel môže byť potrebných tri alebo viac období pred dňom odstavenia vrátane dňa odstavenia (napr. na 13., 17., 21. postnatálny deň). Tie isté zvieratá alebo zvieratá z toho istého vrhu by sa mali testovať aj v dospelom veku krátko pred ukončením štúdie (napr. na 60. - 70. postnatálny deň). Podľa potreby môžu testovania prebiehať aj počas ďalších dní. Motorická aktivita sa monitoruje automatizovaným prístrojom, ktorý zaznamenáva aktivitu a ktorý by mal byť schopný detekovať zvýšenie, ako aj zníženie aktivity (t. j. základná aktivita podľa merania prístroja by nemala byť taká nízka, aby znemožňovala detekciu zníženej aktivity, ani taká vysoká, aby znemožňovala detekciu zvýšenej aktivity). Každý prístroj by sa mal otestovať štandardnými postupmi, aby sa v maximálnej miere zabezpečila spoľahlivosť fungovania všetkých prístrojov počas všetkých dní. Podľa možnosti sa ošetrené skupiny rovnomerne rozdelia medzi jednotlivé prístroje. Každé zviera sa testuje jednotlivo. Ošetrené skupiny sa rovnomerne rozdelia medzi jednotlivé časy testovania, aby sa predišlo mätúcemu vplyvu denného rytmu aktivity. Je potrebné zaistiť, aby boli zmeny testovacích podmienok čo najmenšie a aby neboli systematicky spojené s ošetrením. Medzi premenné, ktoré môžu ovplyvniť mnoho ukazovateľov správania vrátane motorickej aktivity, patrí hladina hluku, veľkosť a tvar pokusnej klietky, teplota, relatívna vlhkosť, svetelné podmienky, pachy, použitie domácej klietky alebo novej pokusnej klietky a rozptýlenie vplyvom prostredia.

Motorické a zmyslové funkcie

36. Motorické a zmyslové funkcie sa podrobne vyšetria najmenej raz v období dospievania a raz u mladého dospelého jedinca (napr. na 60.- 70. postnatálny deň). Informácie o testovaní v čase odstavenia od matky sa uvádzajú v odseku 32. Testovanie by malo byť dostatočné, aby sa zabezpečilo primerané kvantitatívne vzorkovanie zmyslových modalít (napr. somatické zmyslové, vestibulárne) a motorických funkcií (napr. sila, koordinácia). Medzi príklady testov motorických a zmyslových funkcií patrí reflex skríženej extenzie (46), reflex rovnováhy (47)(48), poplašná reakcia na zvukový podnet (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54) a evokovaný potenciál (55).

▼M5

Testy učenia a pamäte

37. Test asociatívneho učenia a pamäte sa vykoná po odstavení (napr. 25. deň ± 2 dni) a u mladých dospelých jedincov (na 60. postnatálny deň a neskôr). Informácie o testovaní v čase odstavenia od matky sa uvádzajú v odseku 32. V týchto dvoch vývojových štádiách možno použiť rovnaký test alebo samostatné testy. U odstavených a dospelých potkanov je pri výbere testov učenia a pamäte povolená určitá miera flexibility. Testy však musia byť navrhnuté tak, aby spĺňali dve kritériá. Po prvé, učenie sa posudzuje buď ako zmena schopnosti v priebehu viacerých opakovaných skúšok alebo testov, alebo v testoch, ktoré pozostávajú z jednej skúšky, s ohľadom na podmienku, ktorou sa zabezpečí kontrola neasociatívnych účinkov procesu učenia. Po druhé, testy by okrem prvotného učenia (nadobúdania zručností) mali zahŕňať meranie pamäte (krátkodobej alebo dlhodobej); toto meranie pamäte však nemožno uviesť do správy bez merania nadobúdania zručností z toho istého testu. Ak testy učenia a pamäte odhalia účinok testovanej chemikálie, možno zvážiť ďalšie testy, aby sa vylúčili alternatívne interpretácie na základe zmien zmyslových, motivačných a/alebo motorických schopností. Okrem dvoch uvedených kritérií sa odporúča, aby sa test učenia a pamäte vybral na základe jeho preukázanej citlivosti na triedu skúmanej chemikálie, pokiaľ sú takéto informácie k dispozícii v literatúre. Ak takéto informácie nie sú k dispozícii, medzi príklady testov, ktoré možno vykonať na splnenie týchto kritérií, patrí: pasívne vyhýbanie sa (43)(56)(57), oneskorená reakcia na pozíciu u dospelých potkanov (58) a nedospelých potkanov (59), úprava čuchových podmienok (43)(60), Morrisovo vodné bludisko (61)(62)(63), Bielovo bludisko alebo Cincinnati bludisko (64)(65), 8-ramenné radiálne bludisko (66), T-bludisko (43) a nadobúdanie a uchovávanie správania riadeného časovým harmonogramom (26)(67)(68). Ďalšie testy sú opísané v literatúre týkajúcej sa odstavených (26)(27) a dospelých potkanov (19)(20).

Vyšetrenie post mortem

38. Materské zvieratá možno po odstavení mláďat utratiť.

39. Neuropatologické hodnotenie mláďat sa vykoná s využitím tkanív z humánne usmrtených zvierat na 22. postnatálny deň alebo skôr, medzi 11. a 22. postnatálnym dňom, a tiež pri ukončení štúdie. U mláďat usmrtených na 22. postnatálny deň sa posudzuje mozgové tkanivo; u zvierat usmrtených na konci sa posudzujú tkanivá centrálnej nervovej sústavy (CNS), ako aj tkanivá periférnej nervovej sústavy (PNS). Zvieratá usmrtené na 22. postnatálny deň alebo skôr možno fixovať ponorením alebo perfúziou. Zvieratá usmrtené na konci štúdie sa fixujú perfúziou. Všetky aspekty prípravy vzoriek tkanív, od perfúzie zvierat, po pitvu vzoriek tkanív, spracovanie tkanív a farbenie sklíčok by sa mali vykonať podľa vyváženej schémy, aby každá sada obsahovala reprezentatívne vzorky z každej dávkovej skupiny. Ďalšie usmernenia k neuropatológii sa uvádzajú v usmerňovacom dokumente OECD č. 20 (9), pozri aj (103).

Spracovanie vzoriek tkanív

40. Všetky makroskopické abnormality viditeľné v čase autopsie by sa mali zaznamenať. Vzorky odobratých tkanív by mali reprezentovať všetky hlavné oblasti nervovej sústavy. Vzorky tkanív sa uchovávajú vo vhodnom fixačnom prostriedku a spracujú sa v súlade so štandardizovanými uverejnenými histologickými protokolmi (69)(70)(71) (103). Zaliatie do parafínu je v prípade tkanív CNS a PNS povolené, ak sa však požaduje vyšší stupeň

▼M5

rozlíšenia, môže byť vhodné použiť osmium po fixácii spolu so zaliatím do epoxidu (napr. v prípade periférnych nervov pri podozrení na periférnu neuropatiu a/alebo pri morfometrickej analýze periférnych nervov). Mozgové tkanivo odobraté na morfometrickú analýzu sa zaleje do vhodného prostriedku pri všetkých úrovniach dávky súčasne, aby sa predišlo zmenšeniu bunkových štruktúr, ktoré môže súvisieť s predĺženým skladovaním vo fixačnom prostriedku (6).

Neuropatologické vyšetrenie

41. Účelom kvalitatívneho vyšetrenia je:

i) identifikovať oblasti v rámci nervovej sústavy, ktoré vykazujú známky neuropatologických zmien;

ii) identifikovať typy neuropatologických zmien, ktoré sú dôsledkom expozície účinkom testovanej chemikálie; a

iii) stanoviť rozsah závažnosti neuropatologických zmien.

Reprezentatívne histologické rezy zo vzoriek tkaniva pod mikroskopom preskúma na tento účel vyškolený patológ s cieľom zistiť neuropatologické zmeny. Všetkým neuropatologickým zmenám sa priradí subjektívna známka indikujúca závažnosť. Na hodnotenie rezov mozgu zo zvierat humánne usmrtených na 22. postnatálny deň alebo skôr môže postačovať farbenie hematoxylínom a eozínom. Pre rezy tkanív CNS a PNS zo zvierat usmrtených na konci štúdie sa však odporúča farbenie myelínom (napr. luxol fast blue/kresyl violet) a striebrom (napr. Bielschowskeho alebo Bodianova metóda). Na základe odborného posúdenia patológa a druhu pozorovaných zmien možno zvážiť iné farbenie vhodné na identifikáciu a charakterizáciu osobitných typov zmien (napr. gliový fibrilárny acidický proteín (GFAP) alebo lektínovú histochémiu na posúdenie gliových a mikrogliových zmien (72), farbenie farbivom Fluoro-Jade na detekciu nekrózy (73)(74) alebo farbenie striebrom špecifické pre nervovú degeneráciu (75)).

42. Malo by sa vykonať morfometrické (kvantitatívne) hodnotenie, keďže tieto údaje môžu pomôcť pri detekcii účinkov spojených s ošetrením a majú význam pre interpretáciu rozdielov hmotnosti alebo morfológie mozgu súvisiacich s aplikáciou chemikálie (76)(77). Na účely morfometrického hodnotenia sa odoberie a pripraví nervové tkanivo. Súčasťou morfometrických hodnotení môžu byť napr. lineárne alebo plošné merania špecifických oblastí mozgu (78). Na lineárne alebo plošné merania je potrebné použiť homologické rezy, ktoré sa uvážlivo zvolia na základe spoľahlivých mikroskopických medzníkov (6). Na zistenie účinkov v dôsledku ošetrenia v prípade parametrov, ako je objem alebo počet buniek konkrétnych neuroanatomických oblastí (79)(80)(81)(82)(83)(84), možno použiť stereológiu.

43. Mozgy sa vyšetria, aby sa zistilo, či nevykazujú známky neuropatologických zmien súvisiacich s ošetrením, a na zabezpečenie dôkladného vyšetrenia sa vhodné vzorky odoberú zo všetkých hlavných oblastí mozgu (napr. čuchové bulby, mozgová kôra, hipokampus, bazálne gangliá, talamus, hypotalamus, stredný mozog (tectum, tegmentum a mozgové stopky), Varolov most, predĺžená miecha, mozoček). Je dôležité, aby sa rezy u všetkých zvierat odobrali v rovnakej rovine. U dospelých jedincov humánne usmrtených na konci štúdie sa odoberú reprezentatívne vzorky rezov miechy a PNS. Vyšetria sa tieto oblasti: oko s očným nervom a sietnicou, zväčšená miecha na krčných a bedrových častiach, tkanivá chrbtové a dutiny, proximálny sedací nerv, proximálny tibiálny nerv (na kolene) a tibiálne vetvy nervu lýtkového svalu. Rezy tkanív miechy a periférnych nervov budú obsahovať krížové, ako aj priečne a pozdĺžne rezy.

▼M5

44. Neuropatologické hodnotenie zahŕňa vyšetrenie príznakov vývojového poškodenia nervovej sústavy (6)(85)(86)(87)(88)(89), okrem bunkových zmien (napr. neuronálna vakuolizácia, degenerácia, nekróza) a zmeny tkanív (napr. glióza, leukocytová infiltrácia, tvorba cýst). V tejto súvislosti je dôležité, aby sa účinky v dôsledku ošetrenia odlíšili od bežných vývojových udalostí, o ktorých je známe, že sa vyskytujú vo vývinovom štádiu, ktoré zodpovedá dobe utratenia (90). Príklady významných zmien, ktoré svedčia o narušení vývoja, zahŕňajú nielen:

— zmeny makroskopickej veľkosti alebo tvaru čuchových bulbov, mozgu alebo mozočka,

— zmeny relatívnej veľkosti rôznych oblastí mozgu vrátane zmenšenia alebo zväčšenia oblastí v dôsledku straty alebo pretrvávania bežne prechodných populácií buniek alebo axonálnych projekcií (napr. vonkajšia zárodočná vrstva mozočka, kalózne teleso),

— zmeny proliferácie, migrácie a diferenciácie, ako indikujú oblasti nadmernej apoptózy alebo nekrózy, zhluky alebo rozptýlené populácie ektopických, dezorientovaných alebo poškodených neurónov alebo zmeny relatívnej veľkosti rôznych vrstiev kortikálnych štruktúr,

— zmeny štruktúr myelinizácie vrátane celkového zmenšenia alebo zmeny zafarbenia myelinizovaných štruktúr,

— známky hydrocefalu, najmä zväčšenie dutín, stenóza Sylviovho kanálika a stenčenie mozgových hemisfér.

Analýza vzťahu medzi dávkou a reakciou v prípade neuropatologických zmien

45. Na kvalitatívne a kvantitatívne neuropatologické analýzy sa odporúča tento postup. Najprv sa porovnajú rezy zo skupiny s vysokou dávkou s rezmi z kontrolnej skupiny. Ak zvieratá zo skupiny s vysokou dávkou nejavia známky neuropatologických zmien, ďalšia analýza nie je potrebná. Ak sa v skupine s vysokou dávkou zistia neuropatologické zmeny, potom sa vyšetria zvieratá zo skupiny so stredne veľkou dávkou a s vysokou dávkou. Ak je skupina s vysokou dávkou ukončená v dôsledku smrti alebo inej neobjasnenej toxicity, skupiny s vysokou a stredne veľkou dávkou sa podrobia analýze na neuropatologické zmeny. Ak sa v skupinách s nižšími dávkami prejavia známky neurotoxicity, tieto skupiny sa podrobia neuropatologickej analýze. Ak sa pri kvalitatívnom alebo kvantitatívnom vyšetrení zistia akékoľvek neuropatologické zmeny v dôsledku ošetrenia, určí sa výskyt v závislosti od dávky, frekvencia a stupeň závažnosti poškodení alebo morfometrických zmien, a to na základe hodnotenia všetkých zvierat zo všetkých dávkových skupín. Do tohto hodnotenia sa zahrnú všetky oblasti mozgu, ktoré vykazujú známky neuropatologických zmien. Pri každom type poškodenia sa uvedú charakteristiky používané na vymedzenie jednotlivých stupňov závažnosti a vlastnosti používané na rozlíšenie jednotlivých stupňov. Frekvencia jednotlivých typov poškodení a ich závažnosti sa zaznamená a vykoná sa štatistická analýza, ktorá vyhodnotí povahu vzťahov medzi dávkou a reakciou. Odporúča sa použiť kódované sklíčka (91).

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

46. Údaje sa do správy uvedú jednotlivo a zhrnú sa v tabuľke, pričom pri každej pokusnej skupine sa uvedú typy zmien a počet matiek, mláďatá podľa pohlavia a vrhy pri jednotlivých typoch zmien. Ak u mláďat došlo k priamej postnatálnej expozícii, do správy sa uvedie spôsob, trvanie a čas expozície.

▼M5

Hodnotenie a interpretácia výsledkov

47. Štúdia vývojovej neurotoxicity prinesie informácie o účinkoch opakovanej expozície účinkom chemikálie *in utero* a v počiatočnom postnatálnom vývojovom štádiu. Keďže dôraz sa kladie tak na všeobecnú toxicitu, ako aj vývojovú neurotoxicitu, výsledky štúdie umožnia rozlíšenie medzi účinkami na neurologický vývoj, ktoré sa vyskytnú pri neprítomnosti všeobecnej toxicity u matky, a účinkami, ktoré sa prejavujú iba pri dávkach, ktoré sú toxické aj pre materské zviera. Vzhľadom na zložité vzájomné súvislosti medzi plánom štúdie, štatistickou analýzou a biologickou významnosťou údajov je súčasťou primeranej interpretácie údajov o vývojovej neurotoxicite aj odborný posudok (107)(109). Interpretácia výsledkov testov by mala byť založená na prístupe váhy dôkazov (20)(92)(93)(94). Štruktúra behaviorálnych alebo morfologických nálezov, pokiaľ sú prítomné, ako aj dôkazy o vzťahu medzi dávkou a reakciou sa rozoberú. Údaje zo všetkých štúdií, ktoré majú význam pre hodnotenie vývojovej neurotoxicity, vrátane epidemiologických štúdií u ľudí alebo kazuistík a experimentálnych štúdií na zvieratách (napr. toxikokinetické údaje, informácie o vzťahu medzi štruktúrou a aktivitou, údaje z iných štúdií toxicity) sa zahrnú do tejto charakterizácie. Sem patrí vzťah medzi dávkami testovanej chemikálie a prítomnosťou/neprítomnosťou, výskytom a rozsahom akýchkoľvek neurotoxických účinkov u každého pohlavia (20)(95).

48. Súčasťou hodnotenia údajov by mala byť diskusia o biologickej a štatistickej významnosti. Štatistickú analýzu treba vnímať ako nástroj, ktorý usmerňuje, nie určuje interpretáciu údajov. Chýbajúca štatistická významnosť by nemala byť jediným dôvodom pre vyvodenie záveru o účinku v dôsledku nepodania chemikálie, rovnako ako by štatistická významnosť nemala byť jediným odôvodnením pre vyvodenie záveru o účinku v dôsledku podania chemikálie. S cieľom zabezpečiť sa proti možným falošným negatívnym zisteniam a vnútorným problémom pri „dokazovaní negatívneho vzťahu“ je potrebné prediskutovať dostupné pozitívne a historické kontrolné údaje, najmä ak podanie chemikálie nevyvolá žiadne účinky (102)(106). Pravdepodobnosť falošných pozitívnych výsledkov by sa mala prediskutovať so zreteľom na celkové štatistické hodnotenie údajov (96). Hodnotenie by sa malo týkať aj vzťahu medzi pozorovanými neuropatologickými a behaviorálnymi zmenami, pokiaľ takýto vzťah existuje.

49. Všetky výsledky sa analyzujú s využitím štatistických modelov, ktoré sú primerané experimentálnej schéme (108). Výber parametrickej alebo neparametrickej analýzy je potrebné odôvodniť vzhľadom na faktory, ako je povaha údajov (transformovaných alebo netransformovaných) a ich distribúcia, ako aj relatívna spoľahlivosť zvolenej štatistickej analýzy. Účel a plán štúdie by mali usmerňovať výber štatistických analýz, aby sa minimalizovali chyby typu I (falošné pozitívne) a typu II (falošné negatívne) (96)(97)(104)(105). V prípade vývojových štúdií využívajúcich multiparitné druhy, pri ktorých sa testuje viacero mláďat z jedného vrhu, by sa do štatistického modelu mal zahrnúť vrh, aby sa predišlo zvýšenej chybovosti typu I (98)(99)(100)(101). Štatistickou mernou jednotkou by mal byť vrh, nie mláďa. Pokusy by mali byť navrhnuté tak, aby sa mláďatá z toho istého vrhu nevyšetrovali nezávisle od seba. Každý sledovaný parameter, ktorý sa u toho istého objektu nameria opakovane, sa podrobí analýze s využitím štatistických modelov, ktoré zaručia, že tieto merania nebudú od seba navzájom nezávislé.

Správa o teste

50. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje vrátane zdroja,

▼M5

— čistota prípravku a známe a/alebo očakávané nečistoty.

Nosič (v prípade potreby):

— odôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda alebo fyziologický roztok.

Pokusné zvieratá:

— použité druhy a kmene a odôvodnenie použitia druhov iných ako potkany,

— dodávateľ pokusných zvierat,

— počet, vek na začiatku testu a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo, voda atď.,

— hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku testu.

Podmienky testovania:

— odôvodnenie výberu úrovne dávok,

— odôvodnenie spôsobu podávania a časového trvania,

— špecifikácia podávaných dávok, vrátane údajov o nosiči, objeme a fyzikálnej forme podávaného materiálu,

— údaje o príprave testovanej chemikálie/krmiva, dosiahnutých koncentráciách, stabilite a homogenite prípravku,

— metóda použitá na jednoznačnú identifikáciu matiek a mláďat,

— podrobný opis postupu randomizácie použitého na priradenie matiek do ošetrovaných skupín, na výber mláďat na utratenie a na priradenie mláďat do testovaných skupín,

— údaje o podávaní testovanej chemikálie,

— konverzia z koncentrácie testovanej chemikálie v strave/vode (ppm) alebo pri inhalácii na samotnú dávku (mg/kg/telesná hmotnosť/deň), ak je to vhodné,

— podmienky prostredia,

— údaje o kvalite potravy a vody (napr. voda z vodovodu, destilovaná),

— dátum začiatku a konca štúdie.

Pozorovania a postupy testovania:

— podrobný opis postupov použitých na štandardizáciu pozorovaní a postupov, ako aj operačné vymedzenia pre vyhodnocovanie pozorovaní,

— zoznam všetkých použitých postupov testovania a odôvodnenie ich použitia,

— údaje o použitých behaviorálnych/funkčných, patologických, neurochemických alebo elektrofyziologických postupoch vrátane informácií a údajov o automatizovaných prístrojoch,

— postupy kalibrácie a na zabezpečenie rovnocennosti prístrojov a vyváženosti ošetrených skupín v postupoch testovania,

— stručné odôvodnenie všetkých rozhodnutí zahŕňajúcich odborné posúdenie.

▼**M5**

Výsledky (individuálne a zhrnuté vrátane strednej hodnoty a rozptylu v prípade potreby):

— počet zvierat na začiatku štúdie a ich počet na konci štúdie,

— počet zvierat a vrhov použitých pri jednotlivých metódach testovania,

— identifikačné číslo každého zvieraťa a vrh, z ktorého pochádza,

— veľkosť vrhu a stredná hmotnosť pri narodení podľa pohlavia,

— údaje o telesnej hmotnosti a o zmene telesnej hmotnosti vrátane konečnej telesnej hmotnosti matiek a mláďat,

— údaje o spotrebe potravy a vody, ak je to vhodné (napr. ak sa testovaná chemikália podáva vo vode),

— údaje o toxikologickej reakcii podľa pohlavia a úrovne dávky vrátane známok toxicity alebo úmrtnosti, času a príčiny smrti, ak je to vhodné,

— charakter, závažnosť, trvanie, deň začiatku, denná doba a následný priebeh podrobných klinických vyšetrení,

— hodnotenie jednotlivých vývojových medzníkov (hmotnosť, pohlavná zrelosť a behaviorálna ontogenéza) v každom období vyšetrenia,

— podrobný opis všetkých behaviorálnych, funkčných, neuropatologických, neurochemických, elektrofyziologických nálezov podľa pohlavia, ako aj zvýšeného alebo zníženého výskytu u kontrolných skupín,

— pitevné nálezy,

— hmotnosť mozgu,

— všetky diagnózy vyvodené na základe neurologických známok a poškodení vrátane ochorení alebo podmienok, ktoré sa vyskytnú prirodzene,

— snímky exemplárnych nálezov,

— snímky vytvorené pri nízkej spotrebe na posúdenie homológie rezov použitých pri morfometrii,

— údaje o absorpcii a metabolizme vrátane doplňujúcich údajov zo samostatnej toxikokinetickej štúdie, ak je k dispozícii,

— štatistické spracovanie výsledkov vrátane štatistických modelov použitých na analýzy údajov a výsledky bez ohľadu na ich významnosť,

— zoznam pracovníkov, ktorí sa zúčastnili štúdie, a odborná príprava.

Rozbor výsledkov:

— údaje o vzťahu medzi dávkou a reakciou podľa pohlavia a skupiny,

— vzťah medzi inými toxickými účinkami pre výsledné posúdenie neurotoxického potenciálu testovanej chemikálie podľa pohlavia a skupiny,

— vplyv akýchkoľvek toxikokinetických informácií na výsledné posúdenie,

— podobnosti účinkov s účinkami akýchkoľvek známych neurotoxických látok,

▼M5

— údaje, ktoré preukazujú spoľahlivosť a citlivosť testovacej metódy (t. j. pozitívne a historické kontrolné údaje),

— vzťah medzi neuropatologickými a funkčnými účinkami, ak existuje,

— NOAEL alebo referenčná dávka pre matky a mláďatá podľa pohlavia a skupiny.

Závery:

— rozbor celkovej interpretácie údajov na základe výsledkov vrátane výsledného posúdenia, či testovaná chemikália viedla k vývojovej neurotoxicite a NOAEL alebo nie.

LITERATÚRA

1. OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Kodaň, Dánsko, 13.-14. jún 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. Dostupné na: [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. Dostupné na: [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. október 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, Paríž. Júl 2008 Dostupné na: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(200816&doclanguage) = en].

9. OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paríž, September 2003. Dostupné na: [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. Kapitola B.34 tejto prílohy, One-generation reproduction toxicity study.

15. Kapitola B.35 tejto prílohy, Two-generation reproduction toxicity study.

16. Kapitola B.43 tejto prílohy, Neurotoxicity Study in Rodents.

17. Kapitola B.31 tejto prílohy, Prenatal developmental toxicity study.

18. Smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2010 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely Ú. v. EÚ L 276, 20.10.2010, s. 33.

19. WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Dostupné na: [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, Ženeva. Dostupné na: [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. A Literature Review. 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, s. 67 -100.

41. Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. Neurobehav. Toxicol., 1:53 - 66.

42. Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, s. 37 - 82.

43. Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3′-iminodipropionitrile in the rat. Neurotoxicol. Teratol., 15:117 - 129.

44. Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. Dev. Psychobiol., 18:247 - 260.

45. Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13:599 - 609.

46. Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 19:1997. 405 - 411.

47. Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals.Physiol. Behav., 64:661 - 669.

48. Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 40:589 - 591.

49. Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, s. 287-351

50. Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. Prog. Neurobiol., 59:107-128.

51. Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, s. 181- 211.

▼**M5**

52. Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. J. Am. Coll. Toxicol., 8:199 -211.

53. Crofton, K.M, Lassiter, T.L, Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. Hear. Res.,80:25 - 30.

54. Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 6:437 - 445.

55. Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. s. 125 - 145.

56. Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3′-iminopropionitrile. Toxicol. Appl. Pharmacol., 105:321 - 332.

57. Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. Neurosci. Behav. Rev., 6:247 -296.

58. Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 10:237 - 244.

59. Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. Behav. Neurosci., 103:98 -105.

60. Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. Develop. Psychobiol., 17:465 - 479.

61. Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods, 11:47 - 60.

62. Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. Int. J. Neurosci., 48:29 - 69.

63. D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res. Rev, 36:60 - 90.

64. Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. Neurotoxicol. Teratol., 9:235 - 241.

65. Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. Drug Chem. Toxicol., 20:387 - 399.

66. Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. Neurotoxicol. Teratol., 10:327 - 332.

67. Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. Toxicol. Appl. Pharmacol., 71:342 - 352.

68. Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. J. Gerontol., 36:338 –341.

69. Fix, A.S, Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. Toxicol. Pathol., 28: 122 - 131.

70. Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, s. 84 - 107.

71. Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, Londýn.

▼**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, s. 3 - 41.

88. Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science, 283:70 - 74.

▼**M5**

89. Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. Science, 287:1056 – 1060.

90. Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.

91. House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. Toxicol. Let., 63:127 - 133.

92. Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. Environ. Health Perspect., 104:401 405.

93. US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-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**

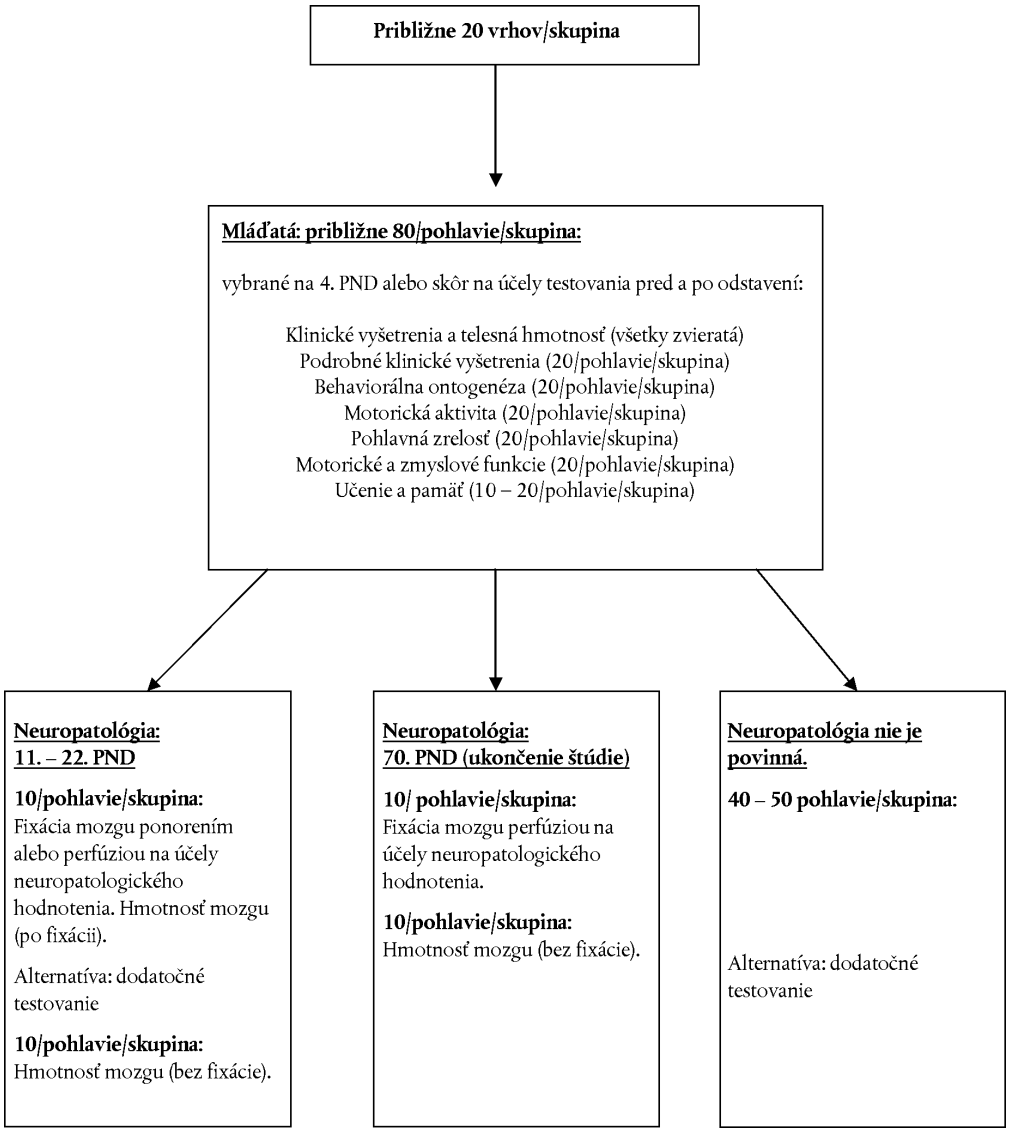
108. Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology 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

Obrázok 1.

Všeobecná schéma testovania pre funkčné/behaviorálne testy, neuropatologické hodnotenie a určenie hmotnosti mozgu. Tento diagram vychádza z opisu v odsekoch 13 - 15 (PND = postnatálny deň). Príklady priradenia sú uvedené v dodatku 1



▼M5

Dodatok 1

1. Príklady možného priradenia sú opísané a uvedené v tabuľkách nižšie. Tieto príklady sú poskytnuté s cieľom názorne poukázať, že existuje viacero rôznych spôsobov, ako priradiť pokusné zvieratá k rôznym testovacím modelom.

Príklad 1

2. Jeden súbor 20 mláďat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec a 1 samica z každého vrhu) sa použije na testovanie behaviorálnej ontogenézy pred odstavením. Z týchto zvierat sa 10 mláďat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec alebo 1 samica z každého vrhu) humánne usmrtí na 22. postnatálny deň. Mozog zvierat sa odoberie, odváži a spracuje pre histopatologické hodnotenie. Okrem toho sa získajú údaje o hmotnosti mozgov podľa mozgov zo zvyšných 10 samcov a 10 samíc pri každej úrovni dávky.

3. Ďalší súbor 20 zvierat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec a 1 samica z každého vrhu) sa použije na funkčné/behaviorálne testy po odstavení (podrobné klinické vyšetrenia, motorická aktivita, testovanie poplašnej reakcie na zvukový podnet a kognitívnych funkcií u dospievajúcich jedincov) a hodnotenie veku pohlavnej zrelosti. Z týchto zvierat sa na konci štúdie (približne na 70. postnatálny deň) podá 10 zvieratám/pohlavie/dávku (t. j. 1 samcovi alebo 1 samici z každého vrhu) anestézia a zafixujú sa použitím perfúzie. Po ďalšom fixovaní in-situ sa mozog odoberie a spracuje pre neuropatologické hodnotenie.

4. Na testovanie kognitívnych funkcií u mladých dospelých jedincov (napríklad na 60. - 70. postnatálny deň) sa použije tretí súbor 20 mláďat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec a 1 samica z každého vrhu). Z týchto zvierat sa na konci štúdie 10 zvierat/pohlavie/dávku (1 samec alebo 1 samica z každého vrhu) usmrtí a mozog sa odoberie a odváži.

5. Zvyšných 20 zvierat/pohlavie/skupinu je vyhradených pre možné ďalšie testy.

Tabuľka 1

Mláďa č. [a]		Počet mláďat priradených na test	Vyšetrenie/test
samce	samice		
1	5	20 samcov + 20 samíc	Behaviorálna ontogenéza
		10 samcov + 10 samíc	Hmotnosť/neuropatológia/ morfometria mozgu na 22. PND
		10 samcov + 10 samíc	Hmotnosť mozgu na 22. PND
2	6	20 samcov + 20 samíc	Podrobné klinické vyšetrenia
		20 samcov + 20 samíc	Motorická aktivita
		20 samcov + 20 samíc	Pohlavná zrelosť
		20 samcov + 20 samíc	Motorické a zmyslové funkcie
		20 samcov + 20 samíc	Učenie a pamäť (25. PND)
		10 samcov + 10 samíc	Hmotnosť/neuropatológia/ morfometria mozgu u mladých dospelých jedincov ~70. PND

▼M5

Mláďa č. [a]		Počet mláďat priradených na test	Vyšetrenie/test
samce	samice		
3	7	20 samcov + 20 samíc	Učenie a pamäť (mladí dospelí jedinci)
		10 samcov + 10 samíc	Hmotnosť mozgu u mladých dospelých jedincov ~ 70. PND
4	8	—	Zvieratá určené ako náhrada alebo na ďalšie testy

[a] V tomto príklade sú vrhy zredukované na 4 samcov + 4 samice; samčie mláďatá sú označené číslami 1 až 4, samičie mláďatá číslami 5 až 8.

Príklad 2

6. Jeden súbor 20 mláďat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec a 1 samica z každého vrhu) sa použije na testovanie behaviorálnej ontogenézy pred odstavením. Z týchto zvierat sa 10 mláďat/pohlavie/dávku (1 samec alebo 1 samica z každého vrhu) humánne usmrtí na 11. postnatálny deň. Mozog zvierat sa odoberie, odváži a spracuje pre histopatologické hodnotenie.

7. Ďalší súbor 20 zvierat/pohlavie/dávku (1 samec a 1 samica z každého vrhu) sa použije na vyšetrenie po odstavení (podrobné klinické vyšetrenia, motorická aktivita, hodnotenie veku pohlavnej zrelosti a motorických a zmyslových funkcií). Z týchto zvierat sa na konci štúdie (približne na 70. postnatálny deň) podá 10 zvieratám/pohlavie/dávku (t. j. 1 samcovi alebo 1 samici z každého vrhu) anestézia a zafixujú sa použitím perfúzie. Po ďalšom fixovaní in situ sa mozog odoberie, odváži a spracuje pre neuropatologické hodnotenie.

8. Na testovanie kognitívnych funkcií u dospievajúcich a mladých dospelých jedincov sa použije 10 mláďat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec alebo 1 samica z každého vrhu). Na testovanie kognitívnych funkcií na 23. postnatálny deň a u mladých dospelých jedincov sa použijú rôzne pokusné zvieratá. Na konci sa 10 zvierat/pohlavie/skupinu, ktoré boli testované ako dospelé jedince, usmrtí a ich mozog sa odoberie a odváži.

9. Zvyšných 20 zvierat/pohlavie/skupinu, ktoré neboli vybrané pre testovanie, sa usmrtí a vyradí pri odstavení.

Tabuľka 2

Mláďa č. [a]		Počet mláďat priradených na test	Vyšetrenie/test
samce	samice		
1	5	20 samcov + 20 samíc	Behaviorálna ontogenéza
		10 samcov + 10 samíc	Hmotnosť/neuropatológia/morfometria mozgu na 11. PND
2	6	20 samcov + 20 samíc	Podrobné klinické vyšetrenia
		20 samcov + 20 samíc	Motorická aktivita
		20 samcov + 20 samíc	Pohlavná zrelosť
		20 samcov + 20 samíc	Motorické a zmyslové funkcie
		10 samcov + 10 samíc	Hmotnosť/neuropatológia/morfometria mozgu u mladých dospelých jedincov ~70. PND

▼M5

Mláďa č. ([a])		Počet mláďat priradených na test	Vyšetrenie/test
samce	samice		
3	7	10 samcov + 10 samíc ([b])	Učenie a pamäť (23. PND)
3	7	10 samcov + 10 samíc ([b])	Učenie a pamäť (mladí dospelí jedinci) Hmotnosť mozgu u mladých dospelých jedincov
4	8	—	Zvieratá usmrtené a vyradené na 21. PND

([a]) V tomto príklade sú vrhy zredukované na 4 samcov + 4 samice; samčie mláďatá sú označené číslami 1 až 4, samičie mláďatá číslami 5 až 8.
([b]) Na kognitívne testy na 23. PND a u mladých dospelých jedincov sa použijú rôzne mláďatá (napr. párne/nepárne vrhy z celkového počtu 20).

Príklad 3

10. Jeden súbor 20 mláďat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec a 1 samica z každého vrhu) sa použije na hodnotenie hmotnosti a neuropatológie mozgu na 11. postnatálny deň. Z týchto zvierat sa 10 mláďat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec alebo 1 samica z každého vrhu) humánne usmrtí na 11. postnatálny deň a mozog zvierat sa odoberie, odváži a spracuje pre histopatologické hodnotenie. Okrem toho sa získajú údaje o hmotnosti mozgov podľa mozgov zo zvyšných 10 samcov a 10 samíc pri každej úrovni dávky.

11. Ďalší súbor 20 zvierat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec a 1 samica z každého vrhu) sa použije na testovanie behaviorálnej ontogenézy (motorickej aktivity), vyšetrenia po odstavení (motorická aktivita a hodnotenie veku pohlavnej zrelosti) a testovanie kognitívnych funkcií u dospievajúcich jedincov.

12. Ďalší súbor 20 zvierat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec a 1 samica z každého vrhu) sa použije na testovanie motorických a zmyslových funkcií (poplašná rekcia na zvukový podnet) a podrobné klinické vyšetrenia. Z týchto zvierat sa na konci štúdie (približne na 70. postnatálny deň) podá 10 zvieratám/pohlavie/dávku (t. j. 1 samcovi alebo 1 samici z každého vrhu) anestézia a zafixujú sa použitím perfúzie. Po ďalšom fixovaní in situ sa mozog odoberie, odváži a spracuje pre neuropatologické hodnotenie.

13. Ďalší súbor 20 mláďat/pohlavie/dávku sa použije na testovanie kognitívnych funkcií u mladých dospelých jedincov (t. j. 1 samec a 1 samica z každého vrhu). Z týchto zvierat sa na konci štúdie 10 zvierat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec alebo 1 samica z každého vrhu) usmrtí a ich mozog sa odoberie a odváži.

Tabuľka 3

Mláďa č. ([a])		Počet mláďat priradených na test	Vyšetrenie/test
samce	samice		
1	5	10 samcov + 10 samíc	Hmotnosť/neuropatológia/ morfometria mozgu na 11. PND
		10 samcov + 10 samíc	Hmotnosť mozgu na 11. PND
2	6	20 samcov + 20 samíc	Behaviorálna ontogenéza (motorická aktivita)
		20 samcov + 20 samíc	Motorická aktivita
		20 samcov + 20 samíc	Pohlavná zrelosť
		20 samcov + 20 samíc	Učenie a pamäť (27. PND)

▼**M5**

Mláďa č. [a]		Počet mláďat priradených na test	Vyšetrenie/test
samce	samice		
3	7	20 samcov + 20 samíc	Poplašná reakcia na zvukový podnet (dospievajúce a mladé dospelé jedince)
		20 samcov + 20 samíc	Podrobné klinické vyšetrenia
		10 samcov + 10 samíc	Hmotnosť/neuropatológia/ morfometria mozgu u mladých dospelých jedincov ~70. PND
4	8	20 samcov + 20 samíc	Učenie a pamäť (mladí dospelí jedinci)
		10 samcov + 10 samíc	Hmotnosť mozgu u mladých dospelých jedincov

[a] V tomto príklade sú vrhy zredukované na 4 samcov + 4 samice; samčie mláďatá sú označené číslami 1 až 4, samičie mláďatá číslami 5 až 8.

▼**M5**

Dodatok 2

Vymedzenia pojmov

Chemikália: látka alebo zmes

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy

▼M5

B.54. **UTEROTROFICKÝ BIOLOGICKÝ TEST U HLODAVCOV: KRÁTKODOBÝ SKRÍNINGOVÝ TEST NA ESTROGÉNNE VLASTNOSTI**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmerneniami OECD na vykonávanie TG 440 (2007). Organizácia OECD v roku 1998 iniciovala aktivitu s vysokou prioritou s cieľom zrevidovať existujúce usmernenia a vypracovať nové usmernenia na vykonávanie testov potenciálnych endokrinných disruptorov (1). Súčasťou tejto činnosti bolo vypracovať usmernenie na vykonávanie uterotrofického biologického testu u hlodavcov. Uterotrofický biologický test u hlodavcov vtedy prešiel rozsiahlym programom validácie, ktorého súčasťou bolo vypracovanie podrobného podkladového dokumentu (2)(3) a vykonanie rozsiahlych intralaboratórnych a medzilaboratórnych štúdií s cieľom preukázať význam a reprodukovateľnosť biologického testu s použitím silného referenčného estrogénu, slabých agonistov estrogénnych receptorov, silných antagonistov estrogénnych receptorov a negatívnej referenčnej chemikálie (4)(5)(6)(7)(8)(9). Testovacia metóda B.54 je výsledkom skúseností nadobudnutých počas programu validácie testu a výsledkov získaných pomocou tohto testu s estrogénnymi agonistami.

2. Uterotrofický biologický test je krátkodobý skríningový test, ktorý vznikol v 30. rokoch 20. storočia (27)(28), a odborný výbor ho prvýkrát štandardizoval na skríning v roku 1962 (32)(35). Je založený na zvýšení hmotnosti maternice alebo uterotrofickej reakcii (pre posúdenie pozri 29). Hodnotí schopnosť chemikálie vyvolať biologické aktivity zodpovedajúce agonistom alebo antagonistom prirodzených estrogénov (napr. 17β-estradiol), na zistenie antagonistov sa však používa oveľa menej ako na zistenie agonistov. Maternica reaguje na estrogény dvoma spôsobmi. Prvá reakcia je nárast hmotnosti v dôsledku nasiaknutia vody. Po tejto reakcii nasleduje hmotnostný prírastok v dôsledku rastu tkaniva (30). Reakcie maternice u potkanov a myší sú kvalitatívne porovnateľné.

3. Tento biologický test slúži ako skríningový test in vivo a jeho použitie je potrebné posudzovať v kontexte „Koncepčného rámca OECD na testovanie a hodnotenie chemikálií ako endokrinných disruptorov“ (dodatok 2). V tomto koncepčnom rámci je uterotrofický biologický test zahrnutý do úrovne 3 ako test in vivo poskytujúcu údaje o jednom endokrinnom mechanizme, t. j. o estrogénnych účinkoch.

4. Uterotrofický biologický test sa má zahrnúť do skupiny testov in vitro a in vivo, ktorých cieľom je identifikovať chemikálie s potenciálnym pôsobením na endokrinný systém a v konečnom dôsledku posúdiť riziká pre ľudské zdravie alebo životné prostredie. Vo validačnom programe OECD sa použili silní aj slabí estrogénni agonisti s cieľom zhodnotiť účinnosť testu pri identifikácii estrogénnych chemikálií (4)(5)(6)(7)(8). Okrem dobrej intralaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti sa tak preukázala aj citlivosť postupu testovania pre estrogénnych agonistov.

5. Pokiaľ ide o negatívne chemikálie, do validačného programu bola zahrnutá iba jedna „negatívna“ referenčná chemikália, ktorej negatívne účinky potvrdil uterotrofický test, ako aj testy viazania receptorov in vitro a testy receptorov, na základe testov, ktoré nesúvisia s validačným programom OECD, však boli vyhodnotené doplňujúce údaje, ktoré tiež potvrdzujú špecifickosť uterotrofického biologického testu pre skríning estrogénnych agonistov (16).

▼**M5**

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

6. Estrogénni agonisti a antagonisti pôsobia ako ligandy pre estrogénne receptory a a b a môžu v uvedenom poradí aktivovať alebo brániť transkripčnému pôsobeniu receptorov. Výsledkom môžu byť nepriaznivé zdravotné riziká vrátane účinkov na rozmnožovanie a vývoj. Existuje preto potreba rýchleho posudzovania a hodnotenia chemikálií ako možných estrogénnych agonistov a antagonistov. Afinita ligandu pre estrogénny receptor alebo transkripčná aktivácia reportérových génov in vitro je iba jedným z viacerých faktorov poukazujúcich na možné riziko, hoci má iba informatívnu hodnotu. Ďalšie faktory môžu zahŕňať metabolickú aktiváciu a deaktiváciu pri vstupe do tela, distribúciu do cieľových tkanív a odstránenie z tela v závislosti – aspoň sčasti – od spôsobu podávania a od testovanej chemikálie. Ak z vlastností chemikálie týkajúcich sa absorpcie – distribúcie – metabolizmu – eliminácie (ADME) nevyplynuli príslušné informácie, vzniká potreba testovať možné účinky chemikálie in vivo za relevantných podmienok. Maternicové tkanivá reagujú na stimuláciu estrogénmi rýchlym a intenzívnym rastom, najmä u laboratórnych hlodavcov, u ktorých estrálny cyklus trvá približne 4 dni. Hlodavce, najmä potkany, sa takisto všeobecne používajú v štúdiách toxicity na charakterizáciu rizika. Preto je maternica hlodavcov vhodný cieľový orgán na testovanie estrogénnych agonistov a antagonistov in vivo.

7. Táto testovacia metóda je založená na protokoloch použitých pri validačnej štúdii OECD, ktoré sa v intralaboratórnych a medzilaboratórnych štúdiách ukázali ako spoľahlivé a opakovateľné (5)(7). V súčasnosti sú k dispozícii dve metódy, t. j. metóda, pri ktorej sa používajú dospelé samice po ovariektómii (metóda dospelých samíc po ovx), a metóda, pri ktorej sa používajú nedospelé samice bez ovariektómie (metóda nedospelých samíc). V programe validácie testov OECD sa ukázalo, že obe metódy majú porovnateľnú citlivosť a reprodukovateľnosť. Metóda nedospelých samíc je však o niečo menej špecifická, keďže má neporušenú os hypotalamus-hypofýza-gonády (HPG), zahŕňa však väčší rozsah vyšetrovania ako metóda dospelých samíc po ovx, pretože môže reagovať na chemikálie, ktoré pôsobia na os HPG a nie len na estrogénny receptor. Os HGP začína u potkana fungovať približne vo veku 15 dní. Predtým nie je možné pubertu urýchliť liečbou, napr. pomocou GnRH. Keď samice začnú pohlavne dospievať, samica má pred otvorením vagíny niekoľko tichých cyklov, ktoré nemajú za následok otvorenie vagíny alebo ovuláciu, ale vyskytujú sa u nej určité hormonálne výkyvy. Ak chemikália priamo alebo nepriamo stimuluje os HPG, výsledkom je predčasná pohlavná zrelosť, skorá ovulácia a urýchlené otvorenie vagíny. Takéto účinky nemajú iba chemikálie, ktoré pôsobia na os HPG, ale aj niektoré krmivá, ktoré majú vyššie hladiny metabolizovateľnej energie ako iné a stimulujú rast a urýchľujú otvorenie vagíny, aj keď nemajú estrogénny charakter. Takéto chemikálie by u dospelých zvierat po ovariektómii nevyvolali uterotrofickú reakciu, pretože ich os HPG nie je funkčná.

8. V záujme dobrých životných podmienok zvierat by sa mala uprednostniť metóda, pri ktorej sa používajú nedospelé potkany, čím sa predíde chirurgickej predpríprave zvierat a tiež možnému nevyužitiu zvierat, ktoré vykazujú akékoľvek znaky začínajúceho estrálneho cyklu (pozri odsek 30).

▼M5

9. Uterotrofická reakcia nemá výhradne estrogénny pôvod, t. j. reakciu môžu vyvolať aj chemikálie, ktoré nie sú estrogénnymi agonistami alebo antagonistami. Napríklad relatívne vysoké dávky progesterónu, testosterónu alebo rôznych syntetických progestínov môžu viesť k stimulačnej reakcii (30). Každá reakcia sa môže histologicky analyzovať na keratinizáciu a kornifikáciu vagíny (30). Pozitívny výsledok uterotrofického biologického testu by mal bez ohľadu na možný pôvod reakcie zvyčajne viesť k ďalším opatreniam s cieľom lepšie ho objasniť. Ďalší dôkaz o estrogénnych účinkoch by mohol vyplynúť z testov in vitro, napríklad z testu viazania estrogénnych receptorov a testu transkripčnej aktivácie, alebo z iných testov in vivo, napríklad z testu samičieho pohlavného dospievania.

10. Vzhľadom na to, že uterotrofický biologický test slúži ako skríningový test in vivo, zvolený validačný prístup splnil svoj účel z hľadiska ohľadu na životné podmienky zvierat aj z hľadiska stratégie viacúrovňového testovania. Na tento účel sa úsilie zameralo na presnú validáciu reprodukovateľnosti a citlivosti na estrogénne účinky – čo je hlavný problém v prípade mnohých chemikálií – zatiaľ čo na zložku testu týkajúcu sa antiestrogénnych účinkov bolo vynaložené nepatrné úsilie. Vzhľadom na veľmi obmedzený počet chemikálií s jednoznačnými antiestrogénnymi vlastnosťami (ktoré nie sú zakryté estrogénnymi účinkami) sa testoval iba jeden antiestrogén so silným účinkom. Preto sa táto testovacia metóda venuje estrogénnemu protokolu, zatiaľ čo protokol opisujúci režim testu so zameraním sa na antagonistov je súčasťou usmerňovacieho dokumentu (37). Reprodukovateľnosť a citlivosť testu na chemikálie s čisto antiestrogénnym pôsobením bude jasnejšie vymedzená neskôr, keď bude postup testovania nejakú dobu v rutinnej prevádzke a identifikujú sa ďalšie chemikálie s týmto druhom pôsobenia.

11. Je zrejmé, že všetky postupy využívajúce zvieratá musia byť v súlade s miestnymi normami starostlivosti o zvieratá. Opisy starostlivosti a zaobchádzania uvedené ďalej predstavujú minimálne normy pre vykonávanie postupov a v prípade, že miestne predpisy sú prísnejšie, budú mať prednosť miestne predpisy, ako napríklad smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2010 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely (38). Ďalšie usmernenia k humánnemu zaobchádzaniu so zvieratami uvádza organizácia OECD (25).

12. Podobne ako pri všetkých testoch využívajúcich živé zvieratá je dôležité pred začiatkom testu zabezpečiť, aby boli údaje naozaj nevyhnutné. Napríklad dve podmienky, pri ktorých môžu byť údaje potrebné, sú:

— potenciál vysokej expozície (úroveň 1 koncepčného rámca, dodatok 2) alebo známky estrogénnych účinkov (úroveň 2) s cieľom skúmať, či takéto účinky môžu nastať *in vivo*,

— účinky poukazujúce na estrogénne účinky v testoch *in vivo* na úrovni 4 alebo 5 s cieľom preukázať, že účinky sa týkali estrogénneho mechanizmu, ktorý nie je možné objasniť pomocou testu *in vitro*.

13. Vymedzenia pojmov použité v tejto testovacej metóde sú uvedené v dodatku 1.

▼M5

PRINCÍP TESTU

14. Citlivosť uterotrofického biologického testu je založená na systéme testovania na zvieratách, v ktorom os hypotalamus-hypofýza-vaječníky nie je funkčná, čo má za následok nízke hladiny endogénneho estrogénu v obehu. Zabezpečí sa tak nízka východisková hmotnosť maternice a maximálny rozsah reakcie na podávané estrogény. U samíc hlodavcov túto požiadavku spĺňajú dva stavy citlivosti na estrogén:

i) nedospelé samice po odstavení a pred pubertou; a

ii) mladé dospelé samice po ovariektómii po uplynutí dostatočného času na regresiu maternicových tkanív.

15. Testovaná chemikália sa podáva denne orálnou sondou alebo podkožnou injekciou. Postupné dávky testovanej chemikálie sa podávajú minimálne dvom skupinám (usmernenie sa uvádza v odseku 33) pokusných zvierat s použitím jednej úrovne dávky pri každej skupine, pričom chemikália sa podáva po dobu troch po sebe nasledujúcich dní v prípade metódy nedospelých samíc a po dobu najmenej troch po sebe nasledujúcich dní v prípade metódy dospelých samíc po ovariektómii. Zvieratá sa pitvú približne 24 hodín po poslednej dávke. V prípade estrogénnych agonistov sa z hľadiska štatisticky významného zvýšenia posudzuje stredná hmotnosť maternice v skupinách zvierat, ktorým sa podala chemikália, v porovnaní so skupinou, ktorej sa podal nosič. Štatisticky významné zvýšenie strednej hmotnosti maternice v pokusnej skupine v tomto biologickom teste svedčí o pozitívnej reakcii.

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

16. Môžu sa použiť bežne používané laboratórne kmene hlodavcov. Počas validácie sa ako príklad použili potkany z kmeňa Sprague-Dawley a Wistar. Kmene, o ktorých je známe, že majú menej citlivú maternicu, alebo sa to o nich predpokladá, sa nepoužívajú. Laboratórium musí preukázať citlivosť použitého kmeňa, ako sa uvádza v odsekoch 26 a 27.

17. Potkany a myši sa v uterotrofickom biologickom teste bežne používajú od 30. rokov 20. storočia. Validačné štúdie OECD sa vykonali iba u potkanov vzhľadom na predpoklad, že oba druhy by mali byť rovnocenné, a preto by v záujme šetrenia zdrojov a zvierat mal na celosvetovú validáciu stačiť jeden druh. Potkan je druh, ktorý sa vyberá vo väčšine štúdií reprodukčnej a vývojovej toxicity. Vzhľadom na rozsiahle historické údaje o myšiach a s cieľom rozšíriť rozsah pôsobnosti testovacej metódy uterotrofického biologického testu u hlodavcov o používanie myší ako pokusného druhu sa vykonala menšia doplňujúca validačná štúdia na myšiach (16). V súlade s pôvodným zámerom ušetriť zdroje a zvieratá bol zvolený preklenovací prístup s obmedzeným počtom testovaných chemikálií, zúčastnených laboratórií a bez testovania kódovaných vzoriek. Z preklenovacej validačnej štúdie v prípade uterotrofického biologického testu u mladých dospelých myší po ovariektómii vyplýva, že údaje získané u potkanov a myší navzájom kvalitatívne a kvantitatívne súhlasia. Ak uterotrofický biologický test prinesie výsledok, ktorý môže viesť k dlhodobej štúdii, v oboch štúdiách sa môžu použiť zvieratá z rovnakého kmeňa a zdroja. Preklenovací prístup bol obmedzený na myši po ovariektómii a správa neposkytuje podrobné údaje pre validáciu modelu nedospelých samíc, preto sa model nedospelých samíc v rámci rozsahu pôsobnosti súčasnej testovacej metódy neberie do úvahy.

▼M5

18. V niektorých prípadoch sa preto môžu namiesto potkanov použiť myši. Výber tohto druhu je potrebné odôvodniť na základe toxikologických, farmakokinetických a/alebo iných kritérií. V prípade myší môžu byť potrebné zmeny v protokole. U myší je napríklad spotreba potravy v pomere k telesnej hmotnosti vyššia ako u potkanov, preto by mal byť obsah fytoestrogénu v potrave u myší nižší ako u potkanov (9)(20)(22).

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

19. Všetky postupy musia byť v súlade s miestnymi normami starostlivosti o pokusné zvieratá. Tieto opisy starostlivosti a zaobchádzania predstavujú minimálne normy a v prípade, že miestne predpisy sú prísnejšie, budú mať prednosť miestne predpisy, ako napríklad smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2010 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely (38). Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C (v rozsahu približne ± 3 °C). Relatívna vlhkosť by mala byť minimálne 30 % a podľa možnosti by nemala presiahnuť maximálnu úroveň 70 % okrem obdobia počas čistenia miestnosti. Cieľom by mala byť relatívna vlhkosť vzduchu 50 - 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé. Pokiaľ ide o denný svetelný rytmus, malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy.

20. Laboratórne krmivo a pitná voda by mali byť k dispozícii neobmedzene. Mladé dospelé zvieratá môžu byť umiestnené jednotlivo alebo v klietkach po skupinách do troch zvierat. Vzhľadom na nízky vek nedospelých zvierat sa odporúča umiestnenie v sociálnych skupinách.

21. Je známe, že laboratórne krmivá s vysokou hladinou fytoestrogénov zvyšujú u hlodavcov hmotnosť maternice dostatočne na to, aby mali vplyv na uterotrofický biologický test (13)(14)(15). V prípade použitia nedospelých zvierat môžu vysoké hladiny fytoestrogénov a metabolizovateľnej energie v laboratórnych krmivách tiež viesť k predčasnej puberte. Prítomnosť fytoestrogénov predovšetkým súvisí s obsahom produktov zo sóje a lucerny v laboratórnych krmivách a preukázalo sa, že koncentrácie fytoestrogénov sa v rôznych šaržiach štandardného laboratórneho krmiva líšia (23). Telesná hmotnosť je dôležitou premennou, pretože množstvo skonzumovanej potravy súvisí s telesnou hmotnosťou. Preto sa skutočná dávka fytoestrogénu skonzumovaného z rovnakého krmiva môže v závislosti od druhu zvierat a veku líšiť (9). U nedospelých samíc potkanov môže byť spotreba potravy v pomere k telesnej hmotnosti približne dvakrát vyššia ako u mladých dospelých samíc po ovariektómii. U mladých dospelých myší môže byť spotreba potravy v pomere k telesnej hmotnosti približne štvornásobne vyššia ako u mladých dospelých samíc potkanov po ovariektómii.

22. Výsledky uterotrofického biologického testu (9)(17)(18)(19) však ukazujú, že obmedzené množstvá fytoestrogénov v krmive sú prijateľné a neznižujú citlivosť biologického testu. Ako usmernenie slúži informácia, že hladiny fytoestrogénov v krmive by u nedospelých samíc potkanov z kmeňa Sprague Dawley a Wistar nemali prekročiť 350 µg ekvivalentov genisteínu/gram laboratórneho krmiva (6)(9). Podobné krmivá by mali byť vhodné aj pri testovaní na mladých dospelých potkanoch po ovariektómii, pretože spotreba potravy v pomere k telesnej hmotnosti je u mladých dospelých jedincov v porovnaní s nedospelými zvieratami nižšia. Ak sa použijú dospelé myši po ovariektómii alebo potkany citlivejšie na fytoestrogény, je potrebné zvážiť proporcionálne zníženie hladiny fytoestrogénu v krmive (20). Okrem toho môžu rozdiely v dostupnej metabolickej energii z rôznych krmív viesť k časovým posunom začiatku puberty (21)(22).

▼M5

23. Pred začiatkom štúdie je potrebné starostlivo vybrať krmivo bez zvýšenej hladiny fytoestrogénov (pre usmernenie pozri (6)(9)) alebo metabolizovateľnej energie, ktorá môže znehodnotiť výsledky (15)(17)(19)(22)(36). Zabezpečenie primeraného fungovania testovacieho systému použitého v laboratóriu podľa odsekov 26 a 27 predstavuje dôležitú kontrolu obidvoch faktorov. V súlade s dobrou laboratórnou praxou (DLP) by sa mala pre istotu odobrať reprezentatívna vzorka z každej šarže krmiva podávaného počas štúdie na účely prípadnej analýzy obsahu fytoestrogénu (napr. v prípade vysokej hmotnosti kontrolnej maternice v porovnaní s historickými kontrolami alebo v prípade neprimeranej reakcie na referenčný estrogén 17alfa-etinylestradiol). Alikvotné časti by sa mali analyzovať v rámci štúdie alebo zmrazené pri teplote –20 °C alebo takým spôsobom, aby sa zabránilo rozkladu vzorky pred analýzou.

24. Niektoré podstielkové materiály môžu obsahovať prirodzene sa vyskytujúce estrogénne alebo antiestrogénne chemikálie (napríklad je známe, že kukuričný klas ovplyvňuje cyklus u potkanov a podľa všetkého má antiestrogénne účinky). Hladina fytoestrogénov vo vybranej podstielke by mala byť minimálna.

Príprava zvierat

25. Pokusné zvieratá bez známok akejkoľvek choroby alebo fyzických abnormalít sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy vzhľadom na ich umiestnenie. Zvieratá sa jednotlivo označia. Nedospelé zvieratá by mali byť počas aklimatizácie umiestnené v klietke so svojimi matkami alebo náhradnými matkami až do odstavenia. Obdobie aklimatizácie pred začatím štúdie by malo u mladých dospelých zvierat a u nedospelých zvierat umiestnených spolu s matkami alebo náhradnými matkami trvať asi 5 dní. Ak sa nedospelé zvieratá získajú ako odstavené mláďatá bez matiek, môže postačovať na aklimatizáciu kratšie obdobie, pretože dávkovanie by sa malo začať okamžite po odstavení (pozri odsek 29).

POSTUP

Overovanie odbornosti laboratória

26. Na overenie odbornosti laboratória sa môžu použiť dve rôzne metódy:

— pravidelné overovanie vychádzajúce z počiatočnej východiskovej pozitívnej kontrolnej štúdie (pozri odsek 27). Aspoň raz za 6 mesiacov a vždy, keď dôjde k zmene, ktorá môže ovplyvniť účinnosť analýzy (napr. nové zloženie krmiva, zmena pracovníkov vykonávajúcich pitvy, zmena kmeňa zvierat alebo zmena dodávateľa atď.), je potrebné overiť citlivosť testovacieho systému (zvierací model) pomocou primeranej dávky (na základe základnej pozitívnej kontrolnej štúdie opísanej v odseku 27) referenčného estrogénu: 17a- etinylestradiol (CAS č. 57-63-6) (EE),

— použitie súbežných kontrol, pričom súčasťou každého testu bude skupina, ktorej sa bude podávať primeraná dávka referenčného estrogénu.

Ak systém nereaguje podľa očakávania, je potrebné preskúmať a podľa potreby upraviť podmienky testovania. Odporúčaná dávka referenčného estrogénu, ktorá sa má použiť pri obidvoch prístupoch, je približne ED70 až 80.

▼M5

27. **Východisková pozitívna kontrolná štúdia** – Pred prvým vykonaním štúdie podľa tejto testovacej metódy je potrebné preukázať odbornosť laboratória otestovaním citlivosti zvieracieho modelu, a to stanovením reakcie na dávku referenčného estrogénu 17a- etinylestradiol (CAS č. 57-63-6) (EE) minimálne v štyroch dávkach. Reakcia na hmotnosť maternice sa porovná s príslušnými historickými údajmi (pozri odkaz (5)). Ak táto východisková pozitívna kontrolná štúdia neprinesie očakávané výsledky, je potrebné preskúmať a upraviť podmienky testovania.

Počet a stav zvierat

28. Každá pokusná a kontrolná skupina by mala zahŕňať aspoň 6 zvierat (na účely protokolov metódy nedospelých samíc, ako aj metódy dospelých samíc po ovx).

Vek nedospelých zvierat

29. V uterotrofickom biologickom teste s nedospelými zvieratami sa musí presne určiť deň narodenia. Dávkovanie by sa malo začať dostatočne včas s cieľom zabezpečiť, aby na konci podávania testovanej chemikálie nedochádzalo k fyziologickému nárastu endogénnych estrogénov spojenému s pohlavným dospievaním. Na druhej strane však existujú dôkazy, že veľmi mladé zvieratá môžu byť menej citlivé. Pri určovaní optimálneho veku musí každé laboratórium vziať do úvahy svoje vlastné podkladové údaje o dospievaní.

Ako všeobecné usmernenie slúži informácia, že dávkovanie u potkanov sa môže začať ihneď po predčasnom odstavení na 18. postnatálny deň (dátum narodenia je postnatálny deň 0). Dávkovanie by sa u potkanov malo podľa možnosti skončiť na 21. postnatálny deň, v každom prípade však pred 25. postnatálnym dňom, pretože v tomto veku začína byť funkčná os hypotalamus-hypofýza-vaječníky a endogénne hladiny estrogénu môžu začať stúpať spolu s nárastom stredných hodnôt východiskovej hmotnosti maternice a zvýšením počtu štandardných odchýlok v skupine (2)(3)(10)(11)(12).

Postup pri ovariektómii

30. V prípade samíc potkanov a myší po ovariektómii (v pokusných a kontrolných skupinách) by sa ovariektómia mala vykonať vo veku 6 až 8 týždňov. U potkanov by medzi ovariektómiou a prvým dňom podávania malo uplynúť minimálne 14 dní, aby sa umožnila regresia maternice na minimálnu stabilnú východiskovú úroveň. U myší by medzi ovariektómiou a prvým dňom podávania malo uplynúť aspoň 7 dní. Keďže na produkciu významných hladín estrogénov v obehu stačí malé množstvo ovariálneho tkaniva (3), zvieratá by sa mali pred použitím testovať aspoň päť po sebe nasledujúcich dní (napr. medzi 10. - 14. dňom po ovariektómii u potkanov) pozorovaním epitelových buniek získaných výterom z vagíny. Ak zvieratá vykazujú známky začínajúceho estrálneho cyklu, nemali by sa použiť. Neskôr je potrebné pri pitve preskúmať zvyšky po vaječníkoch, aby sa odhalili známky prítomnosti ovariálneho tkaniva. Ak sa preukáže jeho prítomnosť, zviera sa nezaradí do výpočtov (3).

31. Postup ovariektómie sa začína po dôkladnej anestézii zvieraťa, keď zviera leží na bruchu. Rez otvárajúci dorzolaterálnu brušnú stenu by mal byť približne 1 cm dlhý a mal by sa začínať v strede medzi spodnou hranicou rebier a lopatou bedrovej kosti, niekoľko milimetrov bočne od laterálneho okraja bedrového svalu. Vaječníky sa odoberú z brušnej dutiny na sterilný podklad. Vaječník sa odpojí v mieste, kde sa vajcovod pripája k telu maternice. Po uistení, že nedochádza k silnému krvácaniu, sa brušná stena zašije a koža uzavrie pomocou šicích svoriek alebo vhodnou sutúrou. Miesta podviazania sú schematicky znázornené na obrázku 1. Použije sa vhodná pooperačná analgézia podľa odporúčania veterinárneho lekára so skúsenosťami so starostlivosťou o hlodavce.

▼M5

Telesná hmotnosť

32. Pri metóde dospelých samíc po ovariektómii nie je medzi telesnou hmotnosťou a hmotnosťou maternice korelácia, pretože na hmotnosť maternice majú vplyv hormóny ako estrogény, nie však rastové faktory, ktoré regulujú veľkosť tela. Pri metóde nedospelých samíc telesná hmotnosť naopak súvisí s hmotnosťou maternice počas dospievania (34). Pri metóde nedospelých samíc by preto váhové odchýlky u zvierat mali byť minimálne a nemali by presahovať ± 20 % strednej hmotnosti. To znamená, že chovateľ by mal štandardizovať veľkosť vrhu s cieľom zabezpečiť, aby boli mláďatá rôznych matiek kŕmené približne rovnako. Zvieratá sa rozdelia do skupín (kontrolných a pokusných) na základe náhodného rozloženia hmotnosti tak, že stredná telesná hmotnosť každej skupiny sa od akejkoľvek inej skupiny štatisticky nebude odlišovať. Je potrebné dbať na to, aby do tej istej pokusnej skupiny neboli priradené zvieratá z rovnakého vrhu, podľa možnosti bez navýšenia počtu vrhov potrebných na testovanie.

Dávkovanie

33. Na určenie možného estrogénneho pôsobenia in vivo testovanej chemikálie zvyčajne postačujú dve dávkové skupiny a jedna kontrolná, preto sa tento model uprednostňuje v záujme dobrých životných podmienok zvierat. Ak je cieľom odvodiť krivku závislosti reakcie od dávky alebo extrapolovať nižšie dávky, sú potrebné aspoň 3 dávkové skupiny. Ak sa vyžadujú informácie nad rámec určenia estrogénneho pôsobenia (napríklad odhad účinnosti), je potrebné zvážiť iný dávkový režim. So zvieratami v kontrolnej skupine sa musí zaobchádzať takisto ako so zvieratami v testovaných skupinách, s výnimkou aplikovania testovanej chemikálie. Ak sa pri podávaní testovanej chemikálie používa nosič, kontrolná skupina dostane rovnaké množstvo nosiča, aké sa použilo v pokusných skupinách (alebo najvyššie množstvo použité v pokusných skupinách, ak sa v jednotlivých skupinách líši).

34. V prípade uterotrofického biologického testu je cieľom vybrať dávky, ktoré zabezpečia prežitie zvierat a ktoré nespôsobujú výraznú toxicitu alebo utrpenie zvierat po troch po sebe nasledujúcich dňoch podávania chemikálie na úrovni maximálne 1 000 mg/kg/deň. Pri navrhovaní a výbere úrovní dávok sa berú do úvahy existujúce údaje o toxicite a (toxiko-) kinetike testovanej chemikálie a príbuzných materiálov. Pri určovaní najvyššej dávky sa musí v prvom rade vziať do úvahy úroveň LD50 a/alebo informácie o akútnej toxicite, aby sa predišlo úhynu, ťažkému utrpeniu alebo bolesti zvierat (24)(25)(26). Najvyššia dávka by mala predstavovať maximálnu prípustnú dávku (MTD); prípustná je aj štúdia vykonaná s dávkou, ktorá vyvolala pozitívnu uterotrofickú reakciu. Dlhé intervaly (napr. polovica log jednotiek zodpovedajúcich progresii dávok na úrovni 3,2 alebo až 1 log jednotky) medzi dávkami sú všeobecne prípustné. Ak nie sú k dispozícii žiadne vhodné údaje, môže sa vykonať vyhľadávací test s cieľom stanoviť dávky, ktoré sa použijú.

35. Ak je prípadne možné odhadnúť estrogénnu účinnosť agonistu z údajov in vitro (alebo in silico), môžu sa tieto údaje pri výbere dávky vziať do úvahy. Napríklad množstvo testovanej chemikálie, ktorá by vyvolala uterotrofické reakcie ekvivalentné referenčnému agonistovi (etinylestradiolu), sa odhaduje na základe jej relatívnej účinnosti in vitro na etinylestradiol. Najvyššia testovaná dávka by sa získala vynásobením tejto ekvivalentnej dávky príslušným násobkom, napr. 10 alebo 100.

▼M5

Úvahy k zisťovaniu rozsahu

36. V prípade potreby sa na niekoľkých zvieratách môže vykonať predbežná štúdia na zistenie rozsahu. V tomto ohľade sa môže použiť usmerňovací dokument OECD č. 19 (25), v ktorom sa vymedzujú klinické príznaky indikujúce toxicitu alebo utrpenie zvierat. Ak je to v rámci tejto štúdie na zistenie rozsahu po troch dňoch podávania možné, maternice sa môžu odobrať a odvážiť približne 24 hodín po poslednej dávke. Tieto údaje môžu potom pomôcť pri plánovaní hlavnej štúdie (pri výbere prijateľnej maximálnej dávky a nižších dávok a odporučení počtu dávkových skupín).

Podávanie dávok

37. Testovaná chemikália sa podáva orálnou sondou alebo podkožnou injekciou. Pri výbere spôsobu podávania je potrebné zohľadniť dobré životné podmienky zvierat a toxikologické aspekty, ako je význam pre expozíciu na ľudí (napríklad orálna sonda ako simulácia požitia, podkožná injekcia ako simulácia vdýchnutia alebo dermálnej absorbcie), ďalej fyzikálno-chemické vlastnosti testovaného materiálu a najmä existujúce toxikologické informácie a údaje o metabolizme a kinetike (napríklad potreba predísť metabolizmu prvého prechodu, vyššia účinnosť určitého spôsobu expozície).

38. Podľa možnosti sa odporúča zvážiť použitie vodného roztoku/suspenzie. Keďže estrogénne ligandy alebo ich metabolické prekurzory sú však väčšinou hydrofóbne, najbežnejším prístupom je použitie roztoku/suspenzie v oleji (napr. kukuričný, arašidový, sezamový alebo olivový olej). Tieto oleje však majú rôzny obsah kalórií a tuku, preto by nosič mohol ovplyvniť príjem metabolizovateľnej energie (ME) a hlavne pri metóde nedospelých samíc by potenciálne mohol viesť k zmene nameraných parametrov, ako je napríklad hmotnosť maternice (33). Pred začiatkom štúdie je preto potrebné každý nosič, ktorý sa použije, testovať použitím kontrol bez nosičov. Testovanú chemikáliu možno rozpustiť v minimálnom množstve etanolu s koncentráciou 95 % alebo v inom vhodnom rozpúšťadle a zriediť na konečné pracovné koncentrácie v testovacom nosiči. Toxické vlastnosti rozpúšťadla musia byť známe a musia sa testovať v samostatnej kontrolnej skupine určenej výhradne na testovanie rozpúšťadla. Ak je testovaná chemikália stabilná, môže sa pri jej rozpúšťaní použiť jemné ohrievanie a intenzívne mechanické pôsobenie. Určí sa stabilita testovanej chemikálie v nosiči. Ak je testovaná chemikália stabilná počas celého trvania štúdie, môže sa pripraviť jeden počiatočný alikvotný podiel testovanej chemikálie a uvedené dávkové riedenia sa môžu pripravovať denne.

39. Časový harmonogram dávkovania bude závisieť od použitého modelu (pozri odsek 29 pre model nedospelých samíc a odsek 30 pre model dospelých samíc po ovariektómii). Nedospelým samiciam potkanov sa podáva dávka testovanej chemikálie denne tri po sebe nasledujúce dni. Trojdňové podávanie sa odporúča aj u samíc potkanov po ovariektómii, ale prípustné sú aj dlhšie expozície, ktoré môžu pomôcť pri určovaní slabo aktívnych chemikálií. U samíc myší po ovariektómii by malo stačiť podávanie počas 3 dní, pričom v prípade silných estrogénnych agonistov neprinesie predĺženie podávania na sedem dní žiadnu významnú výhodu, vo validačnej štúdii sa však tento vzťah nepreukázal v prípade slabých estrogénov (16), preto by sa dávkovanie malo u dospelých myší po ovariektómii predĺžiť na 7 po sebe nasledujúcich dní.Dávku je potrebné podávať približne v rovnakom čase každý deň. Čas podávania dávky sa podľa potreby upraví s cieľom udržiavať konštantnú úroveň dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa (napríklad mg testovanej chemikálie na kg telesnej hmotnosti za deň). Pokiaľ ide o aplikovaný objem, jeho variabilita na základe telesnej hmotnosti sa minimalizuje upravením koncentrácie dávkového roztoku s cieľom zabezpečiť konštantný objem v pomere k telesnej hmotnosti pri všetkých úrovniach dávok a pre všetky spôsoby podávania.

▼M5

40. Ak je testovaná chemikália podávaná cez trubicu, musí sa to realizovať v jednej dennej dávke pre zviera za použitia žalúdočnej trubice alebo vhodnej intubačnej kanyly. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Je potrebné postupovať podľa miestnych usmernení k starostlivosti o zvieratá, objem by však nemal presiahnuť 5 ml/kg telesnej hmotnosti s výnimkou vodných roztokov, pri ktorých sa môže použiť 10 ml/kg telesnej hmotnosti.

41. V prípade podávania testovanej chemikálie pomocou podkožnej injekcie sa chemikália podáva v jednej dennej dávke. Dávky sa vpichujú v oblasti medzi lopatkami alebo v krížovej oblasti pomocou sterilnej ihly (napríklad veľkosť 23 G alebo 25 G) a tuberkulínovej striekačky. Oholenie miesta vpichu nie je povinné. Je potrebné zaznamenať všetky straty, únik na mieste vpichu alebo neúplné podanie dávky. Celkový denný vpichnutý objem na potkana by nemal presiahnuť 5 ml/kg telesnej hmotnosti rozdelených do 2 vpichov s výnimkou vodných roztokov, pri ktorých sa môže použiť 10 ml/kg telesnej hmotnosti.

Pozorovania

Všeobecné a klinické pozorovania

42. Všeobecné klinické pozorovania je potrebné vykonávať aspoň raz denne a v prípade zistenia známok toxicity častejšie. Pozorovania sa podľa možnosti vykonávajú v rovnakom čase (časoch) každý deň a so zreteľom na obdobie najvyšších očakávaných účinkov po dávkovaní. U všetkých zvierat sa sleduje úmrtnosť, chorobnosť a všeobecné klinické príznaky, ako napríklad zmeny v správaní, na koži, kožušine, očiach, slizniciach, výskyt sekrécie, exkrécie a vegetatívnej aktivity (napr. slzenie, piloerekcia, veľkosť zreníc, nezvyčajné dýchanie).

Telesná hmotnosť a spotreba potravy

43. Všetky zvieratá sa musia denne vážiť s presnosťou na 0,1 g, pričom prvé váženie sa vykoná tesne pred začatím testu, t. j. pri rozdeľovaní zvierat do skupín. Nepovinne možno merať množstvo potravy spotrebovanej počas testu, a to vážením kŕmidiel v každej klietke. Výsledky spotreby potravy sa vyjadria v gramoch na potkana na deň.

Pitva a meranie hmotnosti maternice

44. Dvadsaťštyri hodín po poslednom podaní dávky sa potkany humánne usmrtia. Ak je to možné, zvolí sa náhodné poradie pitiev zvierat zo všetkých skupín, aby sa predišlo priamemu postupu jedným alebo druhým smerom podľa dávkových skupín, čo by mohlo mierne ovplyvniť údaje. Cieľom biologického testu je zmerať hmotnosť maternice v mokrom aj vysušenom stave. Mokrá hmotnosť zahŕňa maternicu a obsah tekutín z lúmenu. Vysušená hmotnosť sa meria po vytlačení a odstránení obsahu lúmenu z maternice.

45. Pred pitvou sa u nedospelých zvierat vyšetrí stav otvárania vagíny. Pitva sa začína otvorením brušnej steny pri začiatku lonovej spony. Následne sa od dorzálnej brušnej steny oddelia rohy maternice a vaječníky, ak sú prítomné. Močový mechúr a močovody sa odstránia z ventrálnej a laterálnej strany maternice a vagíny. Fibrózny zrast medzi konečníkom a vagínou sa oddelí, až kým nie je možné identifikovať spojenie vaginálneho otvoru a kože perinea. Maternica a vagína sa od tela oddelia prerezaním vaginálnej steny tesne nad spojením kože perinea, ako je znázornené na obrázku 2. Maternica sa od steny tela oddelí jemným prerezaním maternicového okružia v bode, kde je pripojená k dorzolaterálnej strane jednotlivých rohov maternice po celej ich dĺžke. Po odobratí maternice z tela sa s ňou musí manipulovať

▼M5

dostatočne rýchlo, aby sa predišlo vysychaniu tkanív. Pri malých tkanivách, ako je maternica, je strata hmotnosti z dôvodu vysychania ešte závažnejšia (23). Ak sú prítomné vaječníky, odstránia sa pri vajcovodoch, pričom sa zabráni strate tekutiny z lúmenu maternicového rohu. Ak zviera podstúpilo ovariektómiu, preskúma sa, či zvyšky po vaječníkoch neobsahujú ovariálne tkanivo. Prebytočný tuk a spojivové tkanivá sa odstránia. Vagína sa oddelí od maternice tesne pod krčkom maternice tak, aby kŕčok maternice zostal pripojený k telu maternice, ako je znázornené na obrázku 2.

46. Každá maternica sa premiestni do jednotlivo označenej a odváženej nádoby (napr. Petriho miska alebo plastová lodička na váženie), pričom sa naďalej dbá na to, aby sa predišlo vysychaniu pred vážením (napríklad sa do nádoby môže vložiť filtračný papier mierne navlhčený slaným roztokom). Maternica s tekutinou z lúmenu sa odváži s presnosťou na 0,1 mg (mokrá hmotnosť maternice).

47. Každá maternica sa následne jednotlivo spracuje s cieľom odstrániť tekutinu z lúmenu. Obidva rohy maternice sa prepichnú alebo pozdĺžne narežú. Maternica sa položí na mierne navlhčený filtračný papier (napr. Whatman č. 3) a jemne sa stláča pomocou ďalšieho mierne navlhčeného filtračného papiera s cieľom úplne odstrániť tekutinu z lúmenu. Po odstránení obsahu lúmenu sa maternica odváži s presnosťou na 0,1 mg (vysušená hmotnosť maternice).

48. Na základe hmotnosti maternice na konci štúdie možno potvrdiť, že nebol prekročený primeraný vek u nedospelých neporušených potkanov, v tomto ohľade sú ale rozhodujúce historické údaje o kmeni potkanov, ktoré laboratórium použilo (pozri odsek 56 pre interpretáciu výsledkov).

Nepovinné vyšetrenia

49. Maternica sa po odvážení môže fixovať v 10 % neutrálnom tlmivom roztoku formalínu, aby sa po farbení hematoxylínom a eozínom (HE) mohla histopatologicky vyšetriť. Zodpovedajúcim spôsobom sa môže vyšetriť aj vagína (pozri odsek 9). Okrem toho sa pre kvantitatívne porovnanie môže vykonať morfometrické meranie endometriálneho epitelu.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

50. Údaje zo štúdie by mali zahŕňať:

— počet zvierat na začiatku testu,

— počet a identifikáciu zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu alebo sa usmrtili z humánnych dôvodov, a dátum a čas každého uhynutia alebo humánneho usmrtenia,

— počet a identifikáciu zvierat, ktoré vykazujú známky toxicity, a popis zistených známok toxicity vrátane času nástupu, trvania a závažnosti toxických účinkov a

— počet a identifikáciu zvierat, ktoré vykazujú akékoľvek poškodenia, a popis typu poškodení.

▼M5

51. V rámci údajov o jednotlivých zvieratách sa zaznamená telesná hmotnosť, mokrá hmotnosť maternice a vysušená hmotnosť maternice. Na zistenie, či podávanie testovanej chemikálie spôsobilo štatisticky významné zvýšenie ($p < 0,05$) hmotnosti maternice, sa použijú jednostranné štatistické analýzy agonistov. Na vyšetrenie zmien mokrej a vysušenej hmotnosti maternice súvisiacich s podávaním testovanej chemikálie sa vykonajú primerané štatistické analýzy. Údaje sa napríklad môžu hodnotiť pomocou prístupu analýzy kovariancie (ANCOVA) s využitím telesnej hmotnosti pri pitve ako spolupremennej. Pred vykonaním analýzy údajov sa údaje o maternici môžu podrobiť logaritmickej transformácii na stabilizáciu rozptylu. Na párové porovnania každej dávkovej skupiny s kontrolami nosiča a na výpočet intervalov spoľahlivosti je vhodný Dunnettov a Hsuov test. Na zistenie možných odľahlých hodnôt a posúdenie homogenity rozptylov sa môžu použiť grafy studentizovaných rezíduí. Tieto postupy boli použité vo validačnom programe OECD, v rámci ktorého sa použil PROC GLM v systéme štatistickej analýzy (SAS Institute, Cary, NC), verzia 8 (6)(7).

52. Záverečná správa musí obsahovať:

Testovacie zariadenie:

— zodpovední pracovníci a ich úlohy v rámci štúdie,

— údaje z východiskového pozitívneho kontrolného testu a údaje z periodických pozitívnych kontrol (pozri odsek 26 a 27).

Testovaná chemikália:

— charakteristika testovaných chemikálií,

— fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

— spôsob a periodicita prípravy roztokov,

— všetky získané údaje o stabilite,

— všetky analýzy dávkovacích roztokov.

Nosič:

— charakteristika testovaného nosiča (povaha, dodávateľ a séria),

— odôvodnenie výberu nosiča (ak je iný ako voda).

Pokusné zvieratá:

— druh, kmeň a odôvodnenie ich výberu,

— dodávateľ a konkrétne zariadenie dodávateľa,

— vek v čase dodania s dátumom narodenia,

— v prípade nedospelých zvierat údaj o tom, či boli dodané s matkou alebo s náhradnou matkou, a dátum odstavenia,

— údaje o aklimatizácii zvierat,

— počet zvierat na klietku,

— údaje a metóda označovania jednotlivých zvierat a skupín.

Podmienky testu:

— údaje o postupe randomizácie (t. j. použitá metóda),

— odôvodnenie výberu dávky,

▼**M5**

— údaje o zložení testovanej chemikálie, dosiahnutých koncentráciách, stabilite a homogénnosti,

— údaje o podávaní testovanej chemikálie a odôvodnenie výberu spôsobu expozície,

— krmivo (názov, typ, dodávateľ a hladiny fytoestrogénu, ak sú známe),

— zdroj vody (napríklad voda z vodovodu alebo filtrovaná voda) a dodávanie (prívodom z veľkej nádoby, vo fľašiach, atď.),

— podstielka (názov, typ, dodávateľ, obsah),

— záznam podmienok umiestnenia v klietkach, interval osvetlenia, teplota a vlhkosť v miestnosti, čistenie miestnosti,

— podrobný opis pitvy a postupov váženia maternice,

— opis štatistických postupov.

Výsledky

Pre jednotlivé zvieratá:

— všetky jednotlivé denné telesné hmotnosti (od rozdelenia do skupín po pitvu) (s presnosťou na 0,1 g),

— vek každého zvieraťa (uvádza sa v dňoch, deň narodenia sa počíta ako deň 0) na začiatku podávania testovanej chemikálie,

— dátum a čas každého podania dávky,

— výpočet podaného množstva a dávkovania a všetky pozorované straty v dávkach počas ich podania alebo po ich podaní,

— denný záznam o stave zvieraťa vrátane relevantných príznakov a pozorovaní,

— predpokladaná príčina smrti (ak sa zviera počas štúdie našlo v moribundnom stave alebo uhynuté),

— dátum a čas humánneho usmrtenia a časový interval do posledného podania dávky,

— mokrá hmotnosť maternice (s presnosťou na 0,1 mg) a všetky pozorované straty tekutín z lúmenu počas pitvy a prípravy na váženie,

— vysušená hmotnosť maternice (s presnosťou na 0,1 mg),

Pre každú skupinu zvierat:

— denné stredné telesné hmotnosti (s presnosťou na 0,1 g) a štandardné odchýlky (od rozdelenia do skupín po pitvu),

— stredné mokré hmotnosti maternice a stredné vysušené hmotnosti maternice (s presnosťou na 0,1 mg) a štandardné odchýlky,

— denná spotreba potravy, ak sa merala (vypočítaná na gramy potravy spotrebované na jedno zviera),

▼M5

— výsledky štatistických analýz porovnávajúcich tak mokré, ako aj vysušené hmotnosti materníc z pokusných skupín vzhľadom na rovnaké merania v kontrolných skupinách nosiča,

— výsledky štatistických analýz porovnávajúcich celkovú telesnú hmotnosť a nárast telesnej hmotnosti u pokusných skupín vzhľadom na rovnaké merania v kontrolných skupinách nosiča.

53. Súhrn dôležitých usmerňujúcich faktov testovacej metódy

	Potkany	Myši
Zvieratá		
Kmeň	Bežne používané laboratórne kmene hlodavcov	
Počet zvierat	Minimálne 6 zvierat z každej dávkovej skupiny	
Počet skupín	Minimálne 2 pokusné skupiny (pre usmernenie pozri odsek 33) a negatívna kontrolná skupina Usmernenia k pozitívnym kontrolným skupinám sú uvedené v odseku 26 a 27	
Podmienky umiestnenia a kŕmenia		
T° v miestnosti so zvieratami	22 °C ± 3 °C	
Relatívna vlhkosť	50-60 %, minimálne 30 % a maximálne 70 %	
Denný svetelný cyklus	12 hodín svetla, 12 hodín tmy	
Potrava a pitná voda	Ad libitum	
Umiestnenie	Jednotlivo alebo v skupinách do troch zvierat (u nedospelých zvierat sa odporúča umiestnenie v sociálnych skupinách)	
Krmivo a podstielka	Odporúča sa nízka hladina fytoestrogénov v krmive a podstielke	
Protokol		
Metóda	Metóda nedospelých samíc bez ovariektómie (uprednostňuje sa). Metóda dospelých samíc po ovariektómii	Metóda dospelých samíc po ovariektómii
Vek vhodný pre dávkovanie u nedospelých zvierat	Nie skôr ako 18. PND. Dávkovanie by sa malo ukončiť pred 25. PND	Neuplatňuje sa v rozsahu pôsobnosti súčasnej testovacej metódy
Vek vhodný na ovariektómiu	Vo veku medzi 6 až 8 týždňom	
Vek vhodný pre dávkovanie u zvierat po ovariektómii	Medzi vykonaním ovariektómie a prvým dňom podávania by malo uplynúť minimálne 14 dní	Medzi vykonaním ovariektómie a prvým dňom podávania by malo uplynúť minimálne 7 dní
Telesná hmotnosť	Odchýlky telesnej hmotnosti by mali byť minimálne a nemali by presiahnuť ± 20 % strednej hmotnosti	

▼M5

	Potkany	Myši
Dávkovanie		
Spôsob podávania	Orálnou sondou alebo podkožnou injekciou	
Frekvencia podávania	Jedna denná dávka	
Objemové množstvo na sondu a injekciu	≤ 5ml/kg telesnej hmotnosti (alebo do 10 ml/kg telesnej hmotnosti v prípade vodných roztokov) (v 2 miestach vpichu v prípade podkožnej injekcie)	
Dĺžka podávania	3 po sebe nasledujúce dni v prípade modelu nedospelých samíc Najmenej 3 po sebe nasledujúce dni v prípade modelu dospelých samíc po OVX	7 po sebe nasledujúcich dní v prípade modelu dospelých samíc po OVX
Čas pitvy	Približne 24 hodín po poslednej dávke	
Výsledky		
Pozitívna reakcia	Štatisticky významný nárast strednej hmotnosti maternice (mokrá a/alebo vysušená hmotnosť)	
Referenčný estrogén	17α-etinylestradiol	

USMERNENIE PRE INTERPRETÁCIU A UZNÁVANIE VÝSLEDKOV

54. Vo všeobecnosti sa test estrogénnych účinkov považuje za pozitívny, ak dôjde k štatisticky významnému zvýšeniu hmotnosti maternice ($p < 0,05$) prinajmenšom pri vysokej úrovni dávky v porovnaní s kontrolnou skupinou, v ktorej bolo použité rozpúšťadlo. O pozitívnom výsledku ďalej svedčí preukázanie biologicky vierohodného vzťahu medzi dávkou a rozsahom reakcie po zohľadnení skutočnosti, že prekrývajúce sa estrogénne a antiestrogénne účinky testovanej chemikálie môžu ovplyvniť tvar krivky závislosti reakcie od dávky.

55. V záujme zabezpečenia zmysluplnej interpretácie údajov je potrebné dbať na to, aby sa neprekročila maximálna prípustná dávka. Zníženie telesnej hmotnosti, klinické príznaky a ďalšie nálezy sa musia v tejto súvislosti dôkladne posúdiť.

56. Dôležitým faktorom pre uznanie údajov z uterotrofického biologického testu sú hmotnosti materníc v kontrolnej skupine, ktorej bol podaný nosič. Vysoké kontrolné hodnoty môžu ohroziť citlivosť biologického testu a schopnosť odhaliť veľmi slabých estrogénnych agonistov. Odborná literatúra a údaje získané počas validácie uterotrofického biologického testu naznačujú, že občas môžu spontánne nastať prípady vysokých kontrolných priemerných hodnôt, najmä u nedospelých zvierat (2)(3)(6)(9). Keďže hmotnosť maternice u nedospelých potkanov závisí od mnohých premenných, ako je napríklad kmeň alebo telesná hmotnosť, nie je v prípade hmotnosti maternice možné uviesť konečný horný limit. Pre kontrolu, ak sa vysušená hmotnosť maternice u nedospelých kontrolných potkanov pohybuje medzi 40 a 45 mg, treba tieto výsledky považovať za podozrivé, a hmotnosť maternice nad 45 mg môže viesť k opakovaniu testu. Je však potrebné posudzovať jednotlivé prípady (3)(6)(8). Pri testovaní dospelých potkanov po neúplnej ovariektómii môže ovariálne tkanivo produkovať endogénny estrogén a spomaliť regresiu hmotnosti maternice.

▼M5

57. Vysušená hmotnosť maternice u kontrolného nosiča nižšia ako 0,09 % telesnej hmotnosti nedospelých samíc potkana a nižšia ako 0,04 % v prípade mladých dospelých samíc, ktoré podstúpili ovariektómiu, môže podľa všetkého viesť k prijateľným výsledkom [pozri tabuľku 31 (2)]. Ak je kontrolná hmotnosť materníc vyššia ako tieto hodnoty, je potrebné skontrolovať rôzne faktory, ako je vek zvierat, riadne vykonaná ovariektómia, fytoestrogény v potrave atď. a s výsledkom negatívneho testu (žiadna indikácia estrogénnej aktivity) treba narábať opatrne.

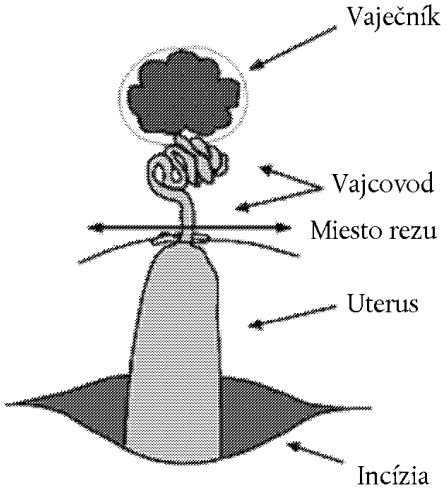
58. Historické údaje o kontrolných skupinách, ktorým sa podal nosič, sa uchovávajú v laboratóriu. V laboratóriu sa uchovávajú aj historické údaje o reakciách na pozitívne referenčné estrogény, ako je 17a-etinylestradiol. Laboratóriá môžu tiež testovať reakciu na známych slabých estrogénnych agonistoch. Všetky tieto údaje možno v záujme zabezpečenia dostatočnej citlivosti metód laboratória porovnať s dostupnými údajmi (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8).

59. V priebehu validačnej štúdie OECD sa ukázalo, že vysušená hmotnosť maternice má nižšiu variabilitu ako mokrá hmotnosť maternice (6)(7). Významná reakcia pri ktoromkoľvek meraní by však indikovala, že testovaná chemikália má vplyv na estrogénnu aktivitu.

60. Uterotrofická reakcia nemá celkom estrogénny pôvod, pozitívny výsledok uterotrofického biologického testu by sa však vo všeobecnosti mal interpretovať ako dôkaz estrogénneho potenciálu in vivo a mal by iniciovať kroky, ktoré by viedli k ďalšiemu objasneniu (pozri odsek 9 a „Koncepčný rámec OECD k testovaniu a hodnoteniu endokrinných disruptorov“, príloha 2).

Obrázok 1

Schematický diagram znázorňujúci chirurgické odstránenie vaječníkov



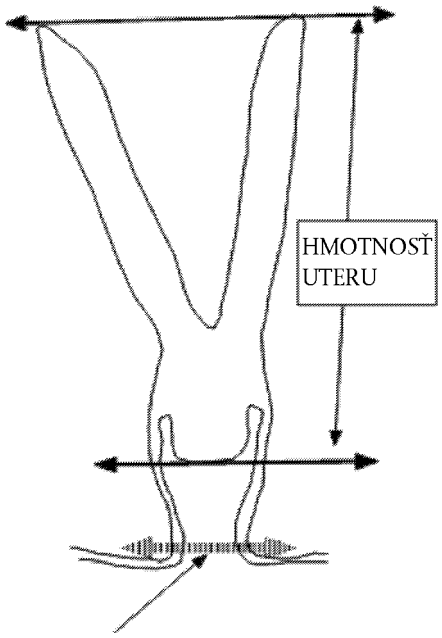
Mezometrium, vaskulatúra a tukový vankúš nie sú znázornené

Postup sa začína otvorením dorzolaterálnej brušnej steny v strede medzi spodnou hranicou rebier a lopatou bedrovej kosti a niekoľko milimetrov bočne od laterálneho okraja bedrového svalu. V brušnej dutine sú umiestnené vaječníky. Na aseptickej oblasti sa následne vaječníky fyzicky odstránia z brušnej dutiny, medzi vaječník a maternicu sa uviaže obväz na zastavenie krvácania a vaječník sa vyreže nad obväzom v mieste, kde sa vajcovod pripája k jednotlivým rohom maternice. Po uistení, že nedochádza k žiadnemu krvácaniu, sa brušná stena zašije a koža uzavrie, napr. pomocou šicích svoriek alebo stehov. Predtým, ako sa zvieratá použijú, sa im umožní, aby sa najmenej po dobu 14 dní zotavili a aby maternica nadobudla pôvodnú hmotnosť.

▼**M5**

Obrázok 2

Odstránenie a príprava maternicových tkanív na váženie



Postup sa začína otvorením brušnej steny pri lonovej spone. Následne sa každý vaječník, ak je prítomný, a roh maternice oddelí od dorzálnej brušnej steny. Močový mechúr a močovody sa odstránia z ventrálnej a laterálnej strany maternice a vagíny. Fibrózny zrast medzi konečníkom a vagínou sa oddelí, až kým nie je možné identifikovať spojenie vaginálneho otvoru a kože perinea. Maternica a vagína sa od tela oddelia prerezaním vaginálnej steny tesne nad spojením kože perinea, ako je znázornené na obrázku. Maternica sa od steny tela oddelí jemným prerezaním maternicového okružia v bode, kde je pripojená k dorzolaterálnej strane jednotlivých rohov maternice po celej ich dĺžke. Po odstránení z tela sa odreže prebytočný tuk a spojivové tkanivo. Ak sú prítomné vaječníky, odstránia sa pri vajcovodoch, pričom sa zabráni strate tekutiny z lúmenu maternicového rohu. Ak zviera podstúpilo ovariektómiu, preskúma sa, či zvyšky po vaječníkoch neobsahujú ovariálne tkanivo. Vagína sa oddelí od maternice tesne pod krčkom maternice tak, aby kŕčok maternice zostal pripojený k telu maternice, ako je znázornené na obrázku. Maternicu možno následne odvážiť.

▼M5

Dodatok 1

VYMEDZENIA POJOMOV

Antiestrogénny účinok je schopnosť chemikálie potlačiť pôsobenie 17*β*-estradiolu na organizmus cicavca.

Chemikália je látka alebo zmes.

Dátum narodenia je postnatálny deň 0.

Dávkovanie je všeobecný pojem, ktorý zahŕňa dávku, jej frekvenciu a trvanie podávania dávok.

Dávka je množstvo podanej testovanej chemikálie. V prípade uterotrofického biologického testu sa dávka vyjadruje ako hmotnosť testovanej chemikálie na jednotku telesnej hmotnosti pokusného zvieraťa na deň (napr. mg/kg telesnej hmotnosti/deň).

Maximálna prípustná dávka (MTD) je najväčšie množstvo chemikálie, ktorá po zavedení do tela pokusné zvieratá nezabije (označovaná ako LD_0) (IUPAC, 1993).

Estrogénny účinok je schopnosť chemikálie pôsobiť ako 17*β*-estradiolu v organizme cicavcov.

Postnatálny deň X je X-tý deň života po dni narodenia.

Citlivosť je podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky, a ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy.

Špecifickosť je podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky, a ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy.

Testovaná chemikália znamená akúkoľvek látku alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Uterotrofický je pojem používaný na opísanie pozitívneho vplyvu na rast maternicových tkanív.

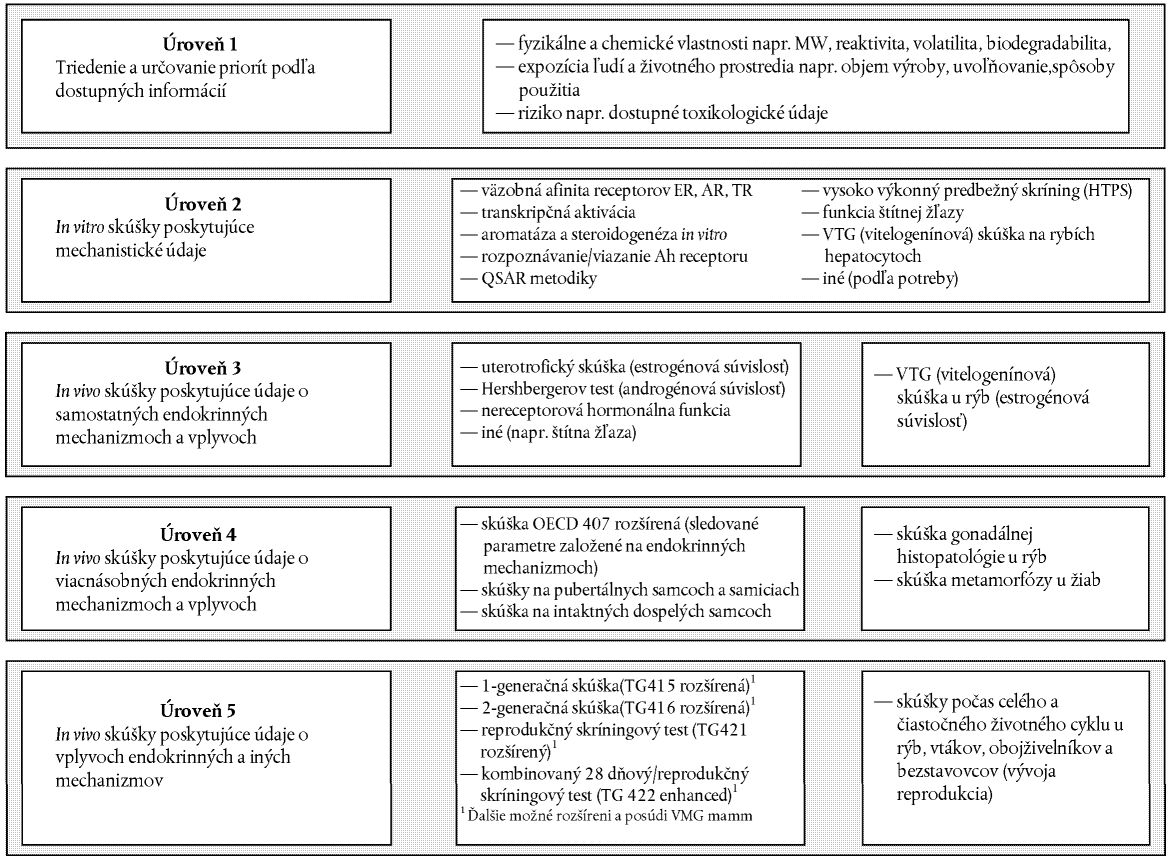
Validácia je vedecký postup určený na charakterizovanie prevádzkových požiadaviek a obmedzení testovacej metódy a na preukázanie jej spoľahlivosti a významu pre konkrétny účel.

▼M5

Dodatok 2

Poznámka: Dokument vypracoval Sekretariát programu na vypracovanie pokynov k testovaniu na základe dohody zo 6. zasadnutia pracovnej skupiny EDTA

Koncepčný rámec OECD na testovanie a hodnotenie chemikálií ako endokrinných disruptorov



VMG mamm: Skupina pre riadenie validácie testovania a posudzovania cicavcov

02008R0440 — SK — 16.10.2019 — 008.001 — 911

▼**M5**

POZNÁMKY K RÁMCU:

Poznámka 1: Vstup na všetkých úrovniach a výstup na všetkých úrovniach je možný a závisí od povahy existujúcich informačných potrieb na účely posúdenia nebezpečnosti a rizík.

Poznámka 2: Na úrovni 5 by ekotoxikológia mala zahŕňať sledované parametre, ktoré indikujú mechanizmy nepriaznivých účinkov a potenciálne poškodenie populácie.

Poznámka 3: Ak multimodálny model zahŕňa viacero testov jedného sledovaného parametra, daný model nahradí používanie týchto testov jedného sledovaného parametra.

Poznámka 4: Každá chemikália by sa mala posudzovať jednotlivo po zohľadnení všetkých dostupných informácií a so zreteľom na funkciu rámcových úrovní.

Poznámka 5: Rámec sa v súčasnosti nepovažuje za úplný. Na úrovniach 3, 4 a 5 zahŕňa testy, ktoré sú buď dostupné, alebo u ktorých prebieha validácia. Pokiaľ ide o testy, u ktorých prebieha validácia, sú zahrnuté predbežne. Po vypracovaní a validácii sa formálne pridajú do rámca.

Poznámka 6: Úroveň 5 zahŕňa aj iné ako konečné testy. Testy zahrnuté do tejto úrovne majú prispieť k všeobecnému posúdeniu nebezpečnosti a rizík.

▼M5

LITERATÚRA

1. OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10. -11. marec 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 17b-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, Paríž.

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. SmernicaEurópskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ o ochrane zvierat používaných na vedecké účely(Ú. v. EÚ L 276, 20.10.2010, s. 33).

▼M5

B.55. **HERSHBERGEROV BIOLOGICKÝ TEST U POTKANOV: KRÁTKODOBÝ SKRÍNINGOVÝ TEST NA (ANTI)ANDROGÉNNE VLASTNOSTI**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmerneniami OECD na vykonávanie testov TG 441 (2009). Organizácia OECD v roku 1998 iniciovala aktivitu s vysokou prioritou s cieľom zrevidovať existujúce usmernenia a vypracovať nové usmernenia na vykonávanie testov potenciálnych endokrinných disruptorov (1). Súčasťou tejto činnosti bolo vypracovať usmernenie na vykonávanie Hershbergerovho biologického testu u potkanov. Vo farmaceutickom priemysle sa tento test používal niekoľko desiatok rokov a odborný výbor ho prvýkrát normalizoval v roku 1962 ako nástroj skríningu androgénnych chemikálií (2). V rokoch 2001 – 2007 prešiel Hershbergerov biologický test u potkanov rozsiahlym validačným programom, ktorý zahŕňal vypracovanie podkladového kontrolného dokumentu (23), zostavenie podrobnej dokumentácie metód (3), vypracovanie príručky pre pitvy (21) a vykonanie rozsiahlych intralaboratórnych a medzilaboratórnych štúdií, ktoré preukazujú spoľahlivosť a reprodukovateľnosť biologického testu. Tieto validačné štúdie boli vykonané na silnom referenčnom androgéne (testosterón propionát (TP)), dvoch silných syntetických androgénoch (trenbolón-acetát a metyl-testosterón), silnom antiandrogénnom liečive (flutamid), silnom inhibítore syntézy (finasterid) prírodného androgénu (dihydrotestosterón-DHT), niekoľkých slabých antiandrogénnych pesticídoch (linuron, vinklozolín, procymidón, p,p' DDE), silnom inhibítore 5α-reduktázy (finasterid) a dvoch známych negatívnych chemikáliách (dinitrofenol a nonylfenol) (4) (5) (6) (7) (8). Táto testovacia metóda je výsledkom dlhodobých minulých skúseností s biologickým testom, skúseností nadobudnutých v priebehu programu validácie testu a výsledkov, ktoré tento test priniesol.

2. Hershbergerov biologický test je krátkodobý skríningový test in vivo založený na použití akcesórnych tkanív samčej rozmnožovacej sústavy. Test vznikol v 30. rokoch 20. storočia a v 40. rokoch bol upravený s cieľom rozšíriť jeho aplikáciu aj na svaly samčej rozmnožovacej sústavy, ktoré sú citlivé na androgény (2) (9 - 15). V 60. rokoch sa pomocou štandardizovanej verzie protokolu vyhodnotilo viac ako 700 možných androgénov (2) (14) a použitie testu na androgény aj na antiandrogény sa v tomto období považovalo za štandardnú metódu (2) (15). Súčasný biologický test je založený na zmenách hmotnosti piatich tkanív, ktoré sú podmienené účinkom androgénov, u kastrovaných peripubertálnych samcov potkana. Posudzuje schopnosť chemikálie vyvolať biologickú aktivitu zodpovedajúcu androgénnym agonistom, antagonistom alebo inhibítorom 5α-reduktázy. Piatimi cieľovými tkanivami, ktoré sú podmienené účinkom androgénov, zaradenými do tejto testovacej metódy sú ventrálna prostata (VP), semenný mechúrik (SV) (vrátane tekutín a koagulačných žliaz), zdvíhač konečníka spolu s bulbokavernóznymi svalmi (LABC), párové Cowperove žľazy (COW) a žaluď (GP). V týchto piatich tkanivách sa u kastrovaných peripubertálnych samcov potkana reakcia na pôsobenie androgénov prejavuje ako zvýšenie absolútnej hmotnosti. Keď sa u týchto tkanív stimuluje zvýšenie hmotnosti podaním silného referenčného androgénu, reakcia všetkých piatich tkanív na podanie antiandrogénov sa prejaví znížením absolútnej hmotnosti. Primárny model Hershbergeroveho biologického testu používa chirurgicky kastrovaných peripubertálnych samcov a bol validovaný vo fáze 1, 2 a 3 programu validácie Hershbergerovho testu.

3. Hershbergerov biologický test slúži ako mechanistický skríningový test androgénnych agonistov, androgénnych antagonistov a inhibítorov 5a-reduktázy in vivo a jeho použitie je potrebné posudzovať v kontexte „Koncepčného rámca OECD na testovanie a hodnotenie endokrinných disruptorov“ (dodatok 2). V tomto koncepčnom rámci je Hershbergerov biologický

▼M5

test zahrnutý do úrovne 3 ako test in vivo poskytujúci údaje o jednom endokrinnom mechanizme, t. j. (anti)androgénnych účinkoch. Mal by sa zaradiť do skupiny testov in vitro a in vivo, ktorých cieľom je identifikovať chemikálie s potenciálnym pôsobením na endokrinný systém a v konečnom dôsledku posúdiť riziká pre ľudské zdravie alebo životné prostredie.

4. V záujme dobrých životných podmienok zvierat s cieľom vyhnúť sa kastračnému zákroku bola snaha vymyslieť alternatívny model Hershbergerovho biologického testu, ktorým bolo použitie intaktných (nekastrovaných) stimulovaných odstavených samcov. Testovacia metóda stimulovaných odstavených samcov prešla validačným postupom (24), z validačných štúdií však vyplynulo, že pri použití modelu Hershbergerovho biologického testu s odstavenými samcami nie je možné pri testovaných dávkach zo slabých antiandrogénov konzistentne určiť účinky androgénov na hmotnosť orgánov. Model preto do tejto testovacej metódy nebol zahrnutý. Uznáva sa však, že jeho použitie je nielen prínosom pre dobré životné podmienky zvierat, ale môže zároveň priniesť informácie o iných mechanizmoch pôsobenia, preto sa tento model uvádza v usmerňovacom dokumente OECD č. 115 (25).

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

5. Androgénni agonisti a antagonisti pôsobia ako ligandy na androgénne receptory, pričom agonisti môžu aktivovať a antagonisti inhibovať transkripciu génov, ktorú riadi receptor. Okrem toho niektoré chemikálie inhibujú premenu testosterónu na silnejší prírodný androgén dihydrotestosterón v niektorých cieľových androgénnych tkanivách (inhibítory 5a-reduktázy). Takéto chemikálie majú potenciál viesť k nepriaznivým zdravotným rizikám vrátane účinkov na rozmnožovanie a vývoj. Existuje preto regulačná potreba rýchleho posudzovania a hodnotenia chemikálií ako možných androgénnych agonistov alebo antagonistov alebo ako inhibítorov 5a-reduktázy. Afinita ligandu pre androgénny receptor meraná väzbou na receptor alebo transkripčná aktivácia reportérových génov in vitro nie je jediným faktorom poukazujúcim na možné riziko, hoci má iba informatívnu hodnotu. Ďalšie faktory môžu zahŕňať metabolickú aktiváciu a deaktiváciu pri vstupe do tela, chemickú distribúciu do cieľových tkanív a odstránenie z tela. Vzniká preto potreba testovať možné pôsobenie chemikálie in vivo za relevantných podmienok a expozície. Potreba hodnotenia in vivo je menej naliehavá, ak sú známe chemické vlastnosti týkajúce sa vzťahu absorpcie – distribúcie – metabolizmu – eliminácie (ADME). Tkanivá podmienené účinkom androgénov reagujú, najmä u kastrovaných peripubertálnych samcov potkana, na stimuláciu androgénmi rýchlym a intenzívnym rastom. Hlodavce, najmä potkany, sa takisto všeobecne používajú v štúdiách toxicity na charakterizáciu rizika. Preto je model analýzy, v ktorom sa používajú kastrované peripubertálne potkany a päť cieľových tkanív, vhodný na in vivo testovanie androgénnych agonistov, antagonistov a inhibítorov 5α-reduktázy.

6. Táto testovacia metóda je založená na protokoloch použitých pri validačnej štúdii OECD, ktoré sa v intralaboratórnych a medzilaboratórnych štúdiách ukázali ako spoľahlivé a opakovateľné (4)(5)(6)(7)(8). V tejto testovacej metóde sa uvádzajú postupy pre androgény aj antiandrogény.

7. Hoci sa v programe OECD pre validáciu Hershbergerovho biologického testu vyskytli v rôznych laboratóriách určité rozdiely medzi dávkami testosterón-propionátu (TP) použitými na detekciu antiandrogénov (0,2 verzus 0,4 mg/kg/d, podkožnou injekciou), tieto dva rôzne protokoly sa nelíšili schopnosťou detekcie slabého alebo silného antiandrogénneho pôsobenia. Je však zrejmé, že dávka TP nesmie byť príliš vysoká, aby neblokovala účinky slabých antagonistov androgénnych receptorov (AR), ani príliš nízka, aby nedošlo k nízkej rastovej reakcii androgénnych tkanív aj bez súčasného podávania antiandrogénov.

▼M5

8. Rastová reakcia jednotlivých tkanív, ktoré sú podmienené androgénnym účinkom, nemá výhradne androgénny pôvod, t. j. zmenu hmotnosti niektorých tkanív môžu vyvolať aj chemikálie, ktoré nie sú androgénni agonisti. Rastová reakcia, ktorá sa prejavuje súčasne vo viacerých tkanivách, je však dôkazom mechanizmu s vyššou príznačnosťou pre androgény. Vysoké dávky silných estrogénov môžu napríklad viesť k zvýšeniu hmotnosti semenných mechúrikov, ale ostatné tkanivá podmienené účinkom androgénov v teste podobnú reakciu nevykazujú. Antiandrogénne chemikálie môžu pôsobiť buď ako antagonisti androgénnych receptorov, alebo ako inhibítory 5a-reduktázy. Účinok inhibítorov 5a-reduktázy je variabilný, pretože premena na silnejší dihydrotestosterón sa líši v závislosti od tkaniva. V porovnaní so silným antagonistom androgénnych receptorov (AR), ako napr. flutamid, sa účinky antiandrogénov, ktoré inhibujú 5α-reduktázu, ako napr. finasterid, prejavujú výraznejšie na ventrálnej prostate ako na ostatných tkanivách. Pomocou tohto rozdielu v reakcii tkaniva možno rozlišovať medzi mechanizmom pôsobenia vyvolaným androgénnym receptorom a 5α-reduktázou. Okrem toho má androgénny receptor evolučnú súvislosť s receptorom iných steroidných hormónov a niektoré ďalšie hormóny môžu pri podávaní vo vysokých suprafyziologických dávkach vytvárať väzby a pôsobiť proti rastovým účinkom TP (13). Ďalej je takisto pravdepodobné, že zvýšený metabolizmus steroidov a následné zníženie sérového testosterónu by mohlo obmedziť rast tkaniva podmieneného účinkom androgénov. Preto by sa akýkoľvek pozitívny výsledok Hershbergerovho biologického testu mal obyčajne hodnotiť na základe váhy dôkazov vrátane testov in vitro, ako sú napríklad testy väzieb na androgénne receptory a estrogénne receptory (ER) a zodpovedajúce testy transkripčnej aktivácie, alebo iných testov in vivo, ktoré skúmajú podobné androgénne cieľové tkanivá, ako je napríklad test na pubertálnych samcoch, 15-dňový test na intaktných dospelých samcoch, 28-dňové alebo 90-dňové štúdie s opakovanými dávkami.

9. Skúsenosti ukazujú, že xenobiotické androgény sú zriedkavejšie ako xenobiotické antiandrogény. Očakáva sa preto, že Hershbergerov biologický test sa bude najčastejšie používať na skríning antiandrogénov. Postup testu na androgény by sa však mohol odporučiť pre steroidné alebo steroidom podobné chemikálie alebo chemikálie, v prípade ktorých bola indikácia možných androgénnych účinkov odvodená pomocou metód zahrnutých do úrovne 1 alebo 2 koncepčného rámca (dodatok 2). Nežiaduce účinky spojené s (anti)androgénnymi profilmi možno pozorovať aj v testoch úrovne 5, čo vedie k potrebe posúdiť, či chemikália pôsobí na endokrinný systém.

10. Uznáva sa, že všetky postupy využívajúce zvieratá by mali byť v súlade s miestnymi normami starostlivosti o zvieratá. Opisy starostlivosti a zaobchádzania uvedené ďalej predstavujú minimálne normy pre vykonávanie postupov a v prípade, že miestne predpisy sú prísnejšie, budú mať prednosť miestne predpisy, ako napríklad smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2010 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely (26). Ďalšie usmernenia k humánnemu zaobchádzaniu so zvieratami uvádza organizácia OECD (17).

11. Rovnako ako v prípade každého biologického testu používajúceho pokusné zvieratá je potrebné dôkladne zvážiť, či je vykonanie tejto štúdie nevyhnutné. V zásade k tomuto rozhodnutiu môžu viesť dva dôvody:

— potenciál vysokej expozície (úroveň 1 koncepčného rámca) alebo známky (anti)androgénnych účinkov v testoch *in vitro* (úroveň 2) s cieľom vyšetriť, či takéto účinky môžu nastať *in vivo*;

— účinky zodpovedajúce (anti)androgénnym účinkom v *in vivo* testoch na úrovni 4 alebo 5 s cieľom vyšetriť konkrétny mechanizmus pôsobenia, napríklad zistiť, či účinky spôsobil (anti)androgénny mechanizmus.

▼M5

12. Vymedzenia pojmov použité v tejto testovacej metóde sú uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

13. Citlivosť Hershbergerovho biologického testu je založená na použití samcov s minimálnou produkciou endogénnych androgénov. Preto sa používajú kastrované samce za predpokladu, že po kastrácii uplynie dostatočný čas na regresiu cieľových tkanív na minimálnu a jednotnú východiskovú hmotnosť. Pri skríningu možnej androgénnej aktivity sú teda v obehu nízke endogénne hladiny androgénov, os hypotalamus-hypofýza-gonády nie je schopná kompenzácie prostredníctvom mechanizmov spätnej väzby, schopnosť reakcie tkanív sa maximalizuje a počiatočná variabilita hmotnosti tkaniva sa minimalizuje. Pri testovaní možnej antiandrogénnej aktivity možno dosiahnuť stabilnejší nárast hmotnosti tkaniva stimuláciou tkanív referenčným androgénom. V dôsledku toho sa pri Hershbergerovom biologickom teste vyžaduje len 6 zvierat na dávkovú skupinu, zatiaľ čo pri iných testoch, ktoré používajú intaktné pubertálne alebo dospelé samce, sa odporúča 15 samcov na dávkovú skupinu.

14. Kastrácia peripubertálnych samcov potkana sa vykoná primeraným spôsobom použitím schválených anestetík a sterilných postupov. V prvých dňoch po operácii by sa mali podávať analgetiká s cieľom zmierniť pooperačné bolesti. Kastrácia zvyšuje presnosť testu pri detekcii slabých androgénov a antiandrogénov, pretože eliminuje kompenzačné endokrinné mechanizmy spätnej väzby, ktoré sa prejavujú u intaktného zvieraťa a ktoré môžu zmierniť účinky podávaných androgénov a antiandrogénov, a vylúči vysokú variabilitu hladiny testosterónu v sére medzi jednotlivými zvieratami. Preto je v dôsledku kastrácie potrebný na testovanie týchto endokrinných aktivít nižší počet zvierat.

15. Pri testovaní možnej androgénnej aktivity sa testovaná chemikália podáva denne orálnou sondou alebo podkožnou injekciou počas desiatich po sebe nasledujúcich dní. Testované chemikálie sa podávajú minimálne dvom ošetrovaným skupinám pokusných zvierat, pričom v každej skupine sa použije jedna úroveň dávky. Zvieratá sa pitvú približne 24 hodín po poslednej dávke. Štatisticky významný nárast hmotnosti dvoch alebo viacerých cieľových orgánov v skupinách, ktorým sa podala testovaná chemikália, v porovnaní s kontrolnou skupinou nosiča indikuje pozitívny test testovanej chemikálie na možný androgénny účinok (pozri odsek 60). Androgény, ako napr. trenbolón, na ktorý nepôsobí 5α-reduktáza, majú v porovnaní s TP výraznejší účinok na LABC a GP, všetky tkanivá by však mali vykazovať zvýšený rast.

16. Pri testovaní možnej antiandrogénnej aktivity sa testovaná chemikália podáva denne orálnou sondou alebo podkožnou injekciou počas desiatich po sebe nasledujúcich dní v rovnakých denných dávkach ako TP (0,2 alebo 0,4 mg/kg/d) podkožnou injekciou. Vo validačnom programe sa stanovuje, že sa môže použiť dávka TP v množstve 0,2 alebo 0,4 mg/kg/d, pretože obidva varianty boli pri určovaní antiandrogénov účinné, a preto by sa v teste mala vybrať iba jedna dávka. Postupné dávky testovaných chemikálií sa podávajú minimálne trom ošetrovaným skupinám pokusných zvierat, pričom v každej skupine sa použije jedna úroveň dávky. Zvieratá sa pitvú približne 24 hodín po poslednej dávke. Štatisticky významné zníženie hmotnosti dvoch alebo viacerých cieľových orgánov v skupinách, ktorým sa podala testovaná chemikália a TP, v porovnaní s kontrolnou skupinou, ktorej sa podal iba TP, indikuje pozitívny test testovanej chemikálie na možný antiandrogénny účinok (pozri odsek 61).

▼M5

OPIS METÓDY

Výber druhu a kmeňa

17. Potkany sa v Hershbergerovom biologickom teste bežne používajú od 30. rokov 20. storočia. Hoci je z biologického hľadiska pravdepodobné, že reakcie u myší by boli podobné ako u potkanov, na základe 70-ročných skúseností s modelom používajúcim potkany sa pre Hershbergerov biologický test vybral tento druh. Údaje získané z Hershbergerovho biologického testu môžu navyše priniesť výsledky, ktoré môžu viesť k dlhodobej viacgeneračnej štúdii, preto sa v oboch štúdiách môžu použiť zvieratá z rovnakého druhu, kmeňa a zdroja.

18. Protokol umožňuje laboratóriám vybrať kmeň potkanov, ktorý bude použitý v teste, a vo všeobecnosti by to mal byť kmeň, ktorý zúčastnené laboratórium používalo v minulosti. Môžu sa použiť bežne používané laboratórne kmene potkanov; nemali by sa ale používať kmene, u ktorých dochádza k dospievaniu podstatne neskôr ako 42 dní po narodení, pretože kastrácia takýchto samcov vo veku 42 dní by mohla znemožniť meranie hmotnosti žaluďa, ktoré možno vykonať až po oddelení predkožky od tela penisu. Preto sa až na výnimočné prípady nepožívajú kmene potkanov vyšľachtené z kmeňa Fischer 344. Pohlavný vývoj u potkanov z kmeňa Fischer 344 prebieha v inom časovom rozmedzí v porovnaní s inými bežnejšie používanými kmeňmi, ako je Sprague Dawley alebo Wistar (16). V prípade použitia takého kmeňa musí laboratórium vykonať kastráciu u zvierat, ktoré sú o niečo staršie, a preukázať citlivosť použitého kmeňa. Laboratórium musí jasne uviesť odôvodnenie výberu kmeňa potkanov. Ak je skríningový test predbežným testom štúdie orálnej toxicity pri opakovaných dávkach, reprodukčnej a vývojovej štúdie alebo dlhodobej štúdie, vo všetkých štúdiách sa podľa možnosti použijú zvieratá z toho istého kmeňa a zdroja.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

19. Všetky postupy musia byť v súlade s miestnymi normami starostlivosti o laboratórne zvieratá. Tieto opisy starostlivosti a zaobchádzania predstavujú minimálne normy a v prípade, že miestne predpisy sú prísnejšie, budú mať prednosť miestne predpisy, ako napríklad smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2010 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely (26). Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C (v rozsahu približne ± 3 °C). Relatívna vlhkosť by mala byť minimálne 30 % a podľa možnosti by nemala presiahnuť maximálnu úroveň 70 % okrem obdobia počas čistenia miestnosti. Cieľom by mala byť relatívna vlhkosť vzduchu 50 - 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé. Pokiaľ ide o denný svetelný rytmus, malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy.

20. S ohľadom na nízky vek zvierat a na skutočnosť, že potkany sú sociálne zvieratá, sa uprednostňuje umiestnenie zvierat v skupinách pred izoláciou zvierat. Umiestnením zvierat po dvoch alebo troch na klietku sa zabráni stiesneniu zvierat a vzniku súvisiaceho stresu, ktorý by mohol narušiť hormonálnu kontrolu vývoja akcesórnych tkanív pohlavných orgánov. Klietky sa musia dôkladne vyčistiť, aby sa odstránili možné kontaminanty, a usporiadať tak, aby sa minimalizovali možné vplyvy vzhľadom na ich umiestnenie. Výberom vhodnej veľkosti klietok (~ 2 000 centimetrov štvorcových) sa zabráni ich preplneniu.

21. Každé zviera sa humánnym spôsobom jednotlivo označí (napr. pomocou ušných značiek alebo štítkov). Metóda značenia sa zaznamená.

▼M5

22. Laboratórne krmivo a pitná voda by mali byť k dispozícii neobmedzene. Laboratóriá by mali v priebehu Hershbergerovho biologického testu používať laboratórne krmivá, ktoré bežne používajú pri chemickom testovaní. Vo validačných štúdiách biologického testu neboli pozorované žiadne účinky ani variabilita na základe použitého krmiva. Použité krmivo sa zaznamená a vzorka laboratórneho krmiva sa uchová pre prípad neskoršej analýzy.

Kritériá pre hmotnosti orgánov podmienených účinkom androgénov

23. Vo validačnej štúdii sa nepreukázalo, že zníženie telesnej hmotnosti má v cieľových tkanivách vplyv na zvýšenie alebo pokles rastu hmotnosti tkaniva (t. j. v tkanivách, ktorých hmotnosť sa má v tejto štúdii vážiť).

24. Na základe porovnania rôznych kmeňov potkanov, ktoré boli úspešne použité vo validačnom programe, sú hmotnosti orgánov podmienených účinkom androgénov vyššie u ťažších kmeňov potkana ako u ľahších kmeňov. Preto sa v kritériách pre Hershbergerov biologický test neuvádzajú absolútne očakávané hmotnosti orgánov pre pozitívne a negatívne kontroly.

25. Vzhľadom na to, že variačný koeficient (CV) pre tkanivo má inverzný vzťah k štatistickej významnosti, kritériá pre Hershbergerov biologický test sú založené na maximálnych hodnotách CV pre každé tkanivo (tabuľka 1). Hodnoty variačného koeficientu sú odvodené z validačných štúdií OECD. V prípade negatívnych výsledkov by laboratóriá mali preskúmať hodnoty variačného koeficientu (CV) z kontrolnej skupiny a ošetrenej skupiny s vysokými dávkami s cieľom určiť, či boli prekročené kritériá maximálnych hodnôt CV.

26. Štúdia sa musí opakovať, ak: 1) tri alebo viac z desiatich možných jednotlivých hodnôt variačného koeficientu v kontrolnej skupine a ošetrených skupinách s vysokými dávkami prekročilo maximálne hodnoty stanovené pre štúdie agonistov a antagonistov v tabuľke 1, a 2) aspoň dve cieľové tkanivá vykazovali zanedbateľné hodnoty, t. j., hodnoty r od 0,05 do 0,10.

Tabuľka 1

Maximálne prípustné hodnoty variačného koeficientu (CV) stanovené pre cieľové akcesórne tkanivá pohlavných orgánov pre model kastrovaných samcov vo validačných štúdiách OECD [1]

Tkanivo	Antiandrogénne účinky	Androgénne účinky
Semenné mechúriky	40 %	40 %
Ventrálna prostata	40 %	45 %
LABC	20 %	30 %
Cowperove žľazy	35 %	55 %
Žaluď	17 %	22 %

[1] Prahová hodnota CV pre dané tkanivo bola stanovená na základe grafického zápisu hodnôt CV – s postupným usporiadaním od najnižšej po najvyššiu – pre všetky prostriedky zo všetkých pokusov vo validačnom teste s použitím konkrétneho modelu (pre agonistov alebo antagonistov). Prahová hodnota CV sa pozorovala od bodu, v ktorom sú prírastky medzi hodnotami až po najbližšie najvyššie hodnoty CV v sérii výrazne väčšie ako niekoľko predchádzajúcich hodnôt CV – „hraničný bod“ (breakpoint). Je potrebné poznamenať, že hoci sa touto analýzou stanovili relatívne spoľahlivé „hraničné body“ pre model testu na antagonistov, v prípade kriviek CV v teste agonistov bol rast rovnomernejší, a preto bolo stanovenie prahovej hodnoty CV touto metódou do istej miery doplnkové.

▼M5

POSTUP

Súlad s predpismi a overovanie laboratória

27. Na rozdiel od uterotrofického testu (kapitola B.54 tejto prílohy) nie je v Hershbergerovom teste potrebné pred začiatkom štúdie preukázať spôsobilosť laboratória, pretože v rámci testu prebiehajú ako jeho neoddeliteľná súčasť súbežné pozitívne (testosterón-propionát a flutamid) a negatívne kontroly.

Počet a stav zvierat

28. Každá ošetrená a kontrolná skupina by mala zahŕňať minimálne 6 zvierat. Týka sa to protokolu v prípade androgénov, ako aj protokolu v prípade antiandrogénov.

Kastrácia

29. Zvieratám sa po prijatí umožní počiatočná niekoľkodňová aklimatizácia s cieľom uistiť sa, že zvieratá sú zdravé a v dobrom stave. Zvieratá sa kastrujú, keď dosiahnu vek 42 dní, t. j. na 42. postnatálny deň (PND) alebo neskôr, nie však skôr, pretože u zvierat kastrovaných pred 42. PND nemusí dôjsť k oddeleniu predkožky. Pred kastráciou sa zvieratám podá anestézia, potom sa nareže miešok, odstránia sa semenníky spolu s nadsemenníkmi a podviažu sa cievy a semenovod. Po uistení sa, že nedochádza ku krvácaniu, sa miešok zašije alebo uzavrie pomocou šicích svoriek. V prvých dňoch po operácii sa zvieratám podávajú analgetiká s cieľom zmierniť pooperačné bolesti. Ak sa zakúpia kastrované zvieratá od dodávateľa, dodávateľ musí potvrdiť vek a stupeň pohlavnej zrelosti zvierat.

Aklimatizácia po kastrácii

30. Aklimatizácia zvierat na laboratórne podmienky by mala pokračovať minimálne 7 dní po kastrácii, aby sa umožnila regresia hmotnosti cieľového tkaniva. Zvieratá je potrebné každý deň pozorovať a odstrániť každé zviera s príznakmi choroby alebo fyzickými abnormalitami. S podávaním dávok (v rámci štúdie) sa teda môže začať už na 49. PND, nie však neskôr ako na 60. PND. Vek pri pitve nesmie byť vyšší ako 70. PND. Táto flexibilita umožňuje laboratóriu efektívne si naplánovať činnosti pri vykonávaní testu.

Telesná hmotnosť a randomizácia skupín

31. Rozdiely v telesnej hmotnosti u jednotlivých zvierat sú zdrojom variability v hmotnostiach tkaniva v rámci jednotlivých skupín zvierat a medzi nimi. Vyššia variabilita hmotnosti tkaniva má za následok zvýšený variačný koeficient (CV) a znižuje štatistickú významnosť testu (niekedy sa označuje ako citlivosť testu). Preto je potrebné experimentálne a štatistické riadenie odchýlok telesnej hmotnosti.

32. Experimentálne riadenie zahŕňa zavedenie malých odchýlok telesnej hmotnosti v rámci pokusných skupín a medzi nimi. Po prvé, nezvyčajne malé alebo veľké zvieratá sa vyradia a nebudú zahrnuté do pokusných skupín. Na začiatku štúdie by hmotnostné odchýlky použitých zvierat nemali presiahnuť ± 20 % strednej hmotnosti (napríklad 175 g ± 35 g u kastrovaných peripubertálnych potkanov). Po druhé, zvieratá sa rozdelia do skupín (kontrolných a ošetrovaných) na základe náhodného rozloženia hmotnosti tak, že stredná telesná hmotnosť každej skupiny sa od akejkoľvek inej skupiny štatisticky nebude odlišovať. Použitý postup blokovej randomizácie sa zaznamená.

▼M5

33. Keďže v dôsledku toxicity sa môže telesná hmotnosť ošetrovaných skupín v porovnaní s kontrolnou skupinou znížiť, namiesto telesnej hmotnosti by sa pri pitve ako štatistická spolupremenná mohla použiť telesná hmotnosť zaznamenaná prvý deň podávania testovanej chemikálie.

Dávkovanie

34. Na určenie možného androgénneho pôsobenia testovanej chemikálie in vivo zvyčajne postačujú dve dávkové skupiny testovanej chemikálie, pozitívna kontrola a (negatívna) kontrola nosiča (pozri odsek 43), preto sa tento model uprednostňuje v záujme dobrých životných podmienok zvierat. Ak je cieľom odvodiť krivku závislosti reakcie od dávky alebo extrapolovať nižšie dávky, sú potrebné aspoň 3 dávkové skupiny. Ak sa vyžadujú informácie nad rámec určenia androgénneho pôsobenia (napríklad odhad účinnosti), je potrebné zvážiť iný dávkový režim. Na účely testovania antiandrogénov sa testovaná chemikália podáva spolu s referenčným androgénnym agonistom. Použijú sa najmenej 3 pokusné skupiny s rôznymi dávkami testovanej chemikálie, pozitívna a negatívna kontrola (pozri odsek 44). So zvieratami v kontrolnej skupine sa musí zaobchádzať takisto ako so zvieratami v testovaných skupinách, s výnimkou aplikovania testovanej chemikálie. Ak sa pri podávaní testovanej chemikálie používa nosič, kontrolná skupina dostane nosič v najvyššom používanom objeme, aký sa použil u pokusných skupín.

35. Pri navrhovaní a výbere úrovní dávok sa berú do úvahy existujúce údaje o toxicite a (toxiko-) kinetike testovanej chemikálie a príbuzných materiálov. Pri určovaní najvyššej dávky sa musí v prvom rade vziať do úvahy úroveň LD_{50} a/alebo informácie o akútnej toxicite, aby sa predišlo úhynu, ťažkému utrpeniu alebo bolesti zvierat (17) (18) (19) (20), a v druhom rade dostupné informácie o dávkach použitých v štúdiách subchronickej a chronickej toxicity. Najvyššia dávka by vo všeobecnosti nemala spôsobiť zníženie konečnej telesnej hmotnosti zvierat väčšie ako 10 % kontrolnej hmotnosti. Najvyššia dávka by mala byť buď 1) najvyššia dávka, ktorá zabezpečí prežitie zvierat a nespôsobuje výraznú toxicitu alebo utrpenie zvierat po 10 po sebe nasledujúcich dňoch podávania chemikálie do maximálnej dávky 1 000 mg/kg/deň (pozri odsek 36), alebo 2) dávka, ktorá vyvolá (anti)androgénne účinky, podľa toho, ktorá dávka je nižšia. Dlhé intervaly, napr. pol log jednotiek (zodpovedajúce priebehu dávky 3,2) alebo až 1 log jednotiek medzi dávkami sú prípustné. Ak nie sú k dispozícii vhodné údaje, môže sa vykonať štúdia na zistenie rozsahu dávkovania (pozri odsek 37) s cieľom stanoviť dávky, ktoré sa použijú.

Limitná úroveň dávky

36. Ak test vykonaný v súlade s opísanými postupmi, pri ktorom sa použije limitná dávka 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň alebo nižšia dávka, nevyvolá štatisticky významnú zmenu hmotnosti reprodukčných orgánov, potom testovanie s ďalšími úrovňami dávok možno považovať za zbytočné. Limitná dávka sa použije s výnimkou prípadov, keď údaje o expozícii u človeka indikujú potrebu použiť vyššiu úroveň dávky.

Úvahy k zisťovaniu rozsahu

37. V prípade potreby sa na niekoľkých zvieratách môže vykonať predbežná štúdia na zistenie rozsahu s cieľom vybrať vhodné dávkové skupiny [na základe metód testovania akútnej toxicity (kapitoly B.1 a, B.1 b tejto prílohy (27), OECD TG 425 (19))]. V prípade Hershbergerovho biologického testu je cieľom vybrať dávky, ktoré zabezpečia prežitie zvierat a ktoré nespôsobujú výraznú toxicitu alebo utrpenie zvierat po desiatich po sebe

▼M5

nasledujúcich dňoch podávania chemikálie, až do limitnej dávky 1 000 mg/kg/deň, ako sa uvádza v odseku 35 a 36. V tomto ohľade možno vychádzať z usmerňovacieho dokumentu OECD (17), v ktorom sa vymedzujú klinické príznaky indikujúce toxicitu alebo utrpenie zvierat. Ak je to v rámci tejto štúdie na zistenie rozsahu po desiatich dňoch podávania možné, cieľové tkanivá sa môžu odobrať a odvážiť približne 24 hodín po podaní poslednej dávky. Tieto údaje možno následne použiť ako východisko pri výbere dávok v hlavnej štúdii.

Referenčné chemikálie a nosič

38. Referenčným androgénnym agonistom je testosterón propionát (TP), č. CAS 57-82-5. Úroveň dávky referenčného TP môže byť 0,2 mg/kg telesnej hmotnosti/deň alebo 0,4 mg/kg telesnej hmotnosti/deň. Referenčným androgénnym antagonistom je flutamid (FT), č. CAS 1311-84-7. Úroveň dávky referenčného FT je 3 mg/kg telesnej hmotnosti/deň a mala by sa podávať spolu s dávkou referenčného TP.

39. Podľa možnosti sa odporúča zvážiť použitie vodného roztoku/suspenzie. Keďže mnohé androgénne ligandy alebo ich metabolické prekurzory sú však väčšinou hydrofóbne, najbežnejším prístupom je použitie roztoku/suspenzie v oleji (napr. kukuričný, arašidový, sezamový alebo olivový olej). Testovanú chemikáliu možno rozpustiť v minimálnom množstve etanolu s koncentráciou 95 % alebo v inom vhodnom rozpúšťadle a zriediť na konečné pracovné koncentrácie v testovacom nosiči. Toxické vlastnosti rozpúšťadla musia byť známe a musia sa testovať v samostatnej kontrolnej skupine určenej výhradne na testovanie rozpúšťadla. Ak je testovaná chemikália stabilná, môže sa pri jej rozpúšťaní použiť jemné ohrievanie a intenzívne mechanické pôsobenie. Určí sa stabilita testovanej chemikálie v nosiči. Ak je testovaná chemikália stabilná počas celého trvania štúdie, môže sa pripraviť jeden počiatočný alikvotný podiel testovanej chemikálie a uvedené dávkové riedenia sa denne môžu pripravovať tak, aby nedošlo ku kontaminácii a znehodnoteniu vzoriek.

Podávanie dávok

40. TP sa podáva podkožnou injekciou a FT orálnou sondou.

41. Testovaná chemikália sa podáva orálnou sondou alebo podkožnou injekciou. Pri výbere spôsobu podávania je potrebné zohľadniť dobré životné podmienky zvierat a fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie. Okrem toho, ak injekcia vedie k pozitívnym výsledkom, pred začiatkom rozsiahleho dlhodobého testovania je pri výbere spôsobu podávania potrebné zohľadniť toxikologické aspekty, ako je význam pre expozíciu u človeka (napríklad orálna sonda ako model požitia, podkožná injekcia ako simulácia vdýchnutia alebo dermálnej absorpcie), a existujúce toxikologické informácie a údaje o metabolizme a kinetike (napríklad potreba predísť metabolizmu prvého prechodu, vyššia účinnosť určitého spôsobu expozície).

42. Chemikália sa zvieratám podáva rovnakým spôsobom a v rovnakej časovej postupnosti počas desiatich po sebe nasledujúcich dní približne v 24-hodinových intervaloch. Úroveň dávok sa denne upravuje na základe súbežných denných meraní telesnej hmotnosti. Objem dávky a čas jej podania sa každý deň expozície zaznamená. V záujme zabezpečenia zmysluplnej interpretácie údajov je potrebné dbať na to, aby sa neprekročila maximálna prípustná dávka uvedená v odseku 35. Zníženie telesnej hmotnosti, klinické príznaky a ďalšie nálezy sa musia v tejto súvislosti dôkladne posúdiť. V prípade

▼M5

orálnej sondy sa použije žalúdočná sonda alebo vhodná intubačná kanyla. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Je potrebné postupovať podľa miestnych usmernení k starostlivosti o zvieratá, objem by však nemal presiahnuť 5 ml/kg telesnej hmotnosti s výnimkou vodných roztokov, pri ktorých sa môže použiť 10 ml/kg telesnej hmotnosti. V prípade podkožných injekcií sa dávky vpichujú v oblasti medzi lopatkami alebo v krížovej oblasti pomocou sterilnej ihly (napríklad veľkosť 23 G alebo 25 G) a tuberkulínovej striekačky. Nevyžaduje sa oholenie miesta vpichu. Je potrebné zaznamenať všetky straty, únik na mieste vpichu alebo neúplné podanie dávky. Celkový denný vpichnutý objem na potkana by nemal presiahnuť 0,5 ml/kg telesnej hmotnosti.

Osobitné postupy pre androgénnych agonistov

43. V prípade testovania androgénnych agonistov predstavuje skupina nosiča negatívnu kontrolu a skupina, ktorej je podávaný TP, pozitívnu kontrolu. Na účely testovania biologickej aktivity zodpovedajúcej androgénnym agonistom sa testovaná chemikália podáva pokusným skupinám vo vybraných dávkach počas 10 po sebe nasledujúcich dní. Na účely zistenia štatisticky významného zvýšenia hmotnosti piatich akcesórnych tkanív pohlavných orgánov v pokusných skupinách, v ktorých sa zvieratám podáva testovaná chemikália, sa tieto hmotnosti porovnajú so skupinou nosiča.

Osobitné postupy v prípade androgénnych antagonistov a inhibítory 5α-reduktázy

44. V prípade testovania androgénnych antagonistov a inhibítorov 5α-reduktázy predstavuje skupina, v ktorej sa zvieratám podáva TP, negatívnu kontrolu a skupina, v ktorej sa zvieratám podávajú referenčné dávky TP spolu s FT, predstavuje pozitívnu kontrolu. Na účely testovania biologickej aktivity zodpovedajúcej androgénnym antagonistom a inhibítorom 5α-reduktázy sa podáva referenčná dávka TP a testovaná chemikália počas 10 po sebe nasledujúcich dní. Na účely zistenia štatisticky významného zníženia hmotnosti piatich akcesórnych tkanív pohlavných orgánov v pokusných skupinách, v ktorých sa zvieratám podáva TP spolu s testovanou chemikáliou, sa tieto hmotnosti porovnajú so skupinou, v ktorej sa zvieratám podáva iba referenčný TP.

POZOROVANIA

Klinické pozorovania

45. Všeobecné klinické pozorovania je potrebné vykonávať aspoň raz denne a v prípade zistenia známok toxicity častejšie. Pozorovania sa podľa možnosti vykonávajú v rovnakom čase (časoch) každý deň a so zreteľom na obdobie najvyšších očakávaných účinkov po dávkovaní. U všetkých zvierat sa sleduje úmrtnosť, chorobnosť a všeobecné klinické príznaky, ako napríklad zmeny v správaní, na koži, kožušine, očiach, slizniciach, výskyt sekrécie, exkrécie a vegetatívnej aktivity (napr. slzenie, piloerekcia, veľkosť zreníc, nezvyčajné dýchanie).

46. Každé uhynuté zviera sa odstráni a vyradí bez ďalšej analýzy údajov. Úmrtnosť zvierat pred pitvou sa uvedie do záznamov štúdie spolu so zjavnými príčinami úmrtnosti. Všetky moribundné zvieratá sa humánne utratia. Všetky moribundné a následne utratené zvieratá sa uvedú do záznamu štúdie spolu so zjavnými príčinami chorobnosti.

▼M5

Telesná hmotnosť a spotreba potravy

47. Všetky zvieratá sa musia denne vážiť s presnosťou na 0,1 g, pričom prvé váženie sa vykoná tesne pred začatím testu, t. j. pri rozdeľovaní zvierat do skupín. Nepovinne možno merať množstvo potravy spotrebovanej počas testu, a to vážením kŕmidiel v každej klietke. Výsledky spotreby potravy sa vyjadria v gramoch na potkana na deň.

Pitva a váženie tkanív a orgánov

48. Približne 24 hodín po poslednom podaní testovanej chemikálie sa potkany utratia a odkrvia v súlade s bežnými postupmi laboratória, ktoré test vykonáva, a vykoná sa pitva. Metóda humánneho utratenia sa zaznamená do správy laboratória.

49. Ak je to možné, zvolí sa náhodné poradie pitiev zvierat zo všetkých skupín, aby sa predišlo priamemu postupu jedným alebo druhým smerom podľa dávkových skupín, čo by mohlo ovplyvniť údaje. Všetky pitevné nálezy, t. j. patologické zmeny/viditeľné poškodenia sa zaznamenajú a uvedú do správy.

50. Päť tkanív podmienených účinkom androgénov (VP, SV, LABC, COW, GP) sa odváži. Tieto tkanivá sa vypreparujú, dôkladne zbavia prebytočného priľnavého tkaniva a tuku a určí sa ich čerstvá (nefixovaná) hmotnosť. S každým tkanivom je potrebné zaobchádzať veľmi opatrne, aby sa predišlo strate tekutín a vysychaniu, ktoré by vzhľadom na nižšie zaznamenané hmotnosti mohli viesť k významným chybám a variabilite. Niektoré tkanivá môžu byť veľmi malé alebo sa môžu ťažko pitvať, čo povedie k variabilite. Je preto dôležité, aby osoby, ktoré vykonávajú pitvu akcesórnych tkanív pohlavných orgánov poznali štandardné postupy pitvy týchto tkanív. Príručku štandardných operačných postupov (SOP) pri pitve poskytuje organizácia OECD (21). Dôkladnou prípravou v súlade s príručkou SOP sa minimalizuje potenciálny zdroj variability v štúdii. Podľa možnosti by za pitvu daného tkaniva mal byť zodpovedný ten istý prosektor, aby sa predišlo individuálnym rozdielom pri spracovaní tkaniva. Ak to nie je možné, pitva by sa mala navrhnúť tak, aby každý prosektor pitval dané tkanivo zo všetkých ošetrených skupín a jeden prosektor pitval všetky tkanivá z kontrolnej skupiny, zatiaľ čo ďalšia osoba by bola zodpovedná za ošetrené skupiny. Všetky akcesórne tkanivá pohlavných orgánov sa odvážia bez vysušenia s presnosťou na 0,1 mg a hmotnosti pre jednotlivé zvieratá sa zaznamenajú.

51. Niektoré tkanivá môžu byť veľmi malé alebo sa môžu ťažko pitvať, čo povedie k variabilite. Predchádzajúce práce poukázali na rozsah variačného koeficientu (CV), ktorý sa podľa všetkého líši v závislosti od odbornosti laboratória. V niektorých prípadoch boli v rámci konkrétneho laboratória pozorované veľké rozdiely absolútnych hmotností tkanív, ako je VP a COWS.

52. Váženie pečene, páru obličiek a páru nadobličiek je nepovinné. Tkanivá sa opäť zbavia akýchkoľvek priľnavých tkanív a tuku. Hmotnosť pečene sa odváži a zaznamená s presnosťou na 0,1 g a hmotnosť obličiek sa odváži a zaznamená s presnosťou na 0,1 mg. Nielenže androgény vplývajú na pečeň, obličky a nadobličky, tieto orgány zároveň slúžia ako užitočné ukazovatele toxicity systému.

▼**M5**

53. Meranie sérového luteinizačného hormónu (LH), folikulárneho stimulujúceho hormónu (FSH) a testosterónu (T) je nepovinné. Hladiny sérového T majú význam pri určovaní, či testovaná chemikália indukuje metabolizmus testosterónu v pečeni, čo vedie k zníženiu hladín séra. Bez údajov o T sa môže zdať, že k takémuto účinku dochádza prostredníctvom antiandrogénneho mechanizmu. Hladiny LH poskytujú informácie o schopnosti antiandrogénu nielen znížiť hmotnosť orgánu, ale aj ovplyvniť funkciu hypotalamu-hypofýzy, čo v dlhodobých štúdiách môže vyvolať nádory na semenníkoch. FSH je dôležitý hormón pre spermatogenézu. Merania sérového T4 a T3 sú takisto nepovinné merania, ktoré by priniesli užitočné dodatočné informácie o schopnosti narúšať homeostázu hormónov štítnej žľazy. Ak sa majú vykonať merania hormónov, potkanom sa pred pitvou podá anestézia a odoberie sa im krv punkciou srdca, pričom pri výbere metódy anestézie sa dbá na to, aby neovplyvnila merania hormónov. Metóda prípravy séra, zdroj rádioimunologickej analýzy a ostatné meracie zariadenia, analytické postupy a výsledky sa zaznamenajú. Hladiny LH sa do správy uvedú v ng/ml séra, rovnako ako hladina T.

54. Opis pitvy tkanív je uvedený ďalej spolu s podrobným pitevným postupom a fotografiami, ktoré boli v rámci validačného programu zverejnené ako doplnkový materiál (21). Na webovej stránke kórejskej Správy pre potraviny a liečivá (Korea Food and Drug Administration) je k dispozícii aj video (22).

— V polohe, keď je zviera otočené bruchom nahor, zistite, či sa predkožka penisu oddelila od žaluďa. Ak áno, stiahnite predkožku a odstráňte žaluď, odvážte ho (s presnosťou na 0,1 mg) a hmotnosť zaznamenajte.

— Otvorte brušnú kožu a stenu tak, aby bolo vidno vnútornosti. Ak sa vážia nepovinné orgány, odstráňte a odvážte pečeň s presnosťou na 0,1 g, odstráňte žalúdok a črevá, odstráňte pár obličiek a pár nadobličiek a odvážte ich s presnosťou na 0,1 mg. Týmto vypreparovaním sa odhalí močový mechúr a začína sa preparovanie cieľových samčích akcesórnych tkanív.

— Na pitvu VP oddeľte močový mechúr od brušnej svalovej vrstvy prerezaním spojivového tkaniva pozdĺž stredovej osi. Posuňte močový mechúr dopredu smerom k semenným mechúrikom, čím sa odhalí ľavý a pravý lalok ventrálnej prostaty (pokrytý tukovou vrstvou). Opatrne odstráňte tuk z pravého a ľavého laloku VP. Jemne odoberte pravý lalok VP z močovej trubice a vyrežte lalok z močovej trubice. Zatiaľ čo držíte pravý lalok VP, jemne odoberte ľavý lalok VP z močovej trubice a následne ho vyrežte, odvážte s presnosťou na 0,1 mg a hmotnosť zaznamenajte.

— Na pitvu SVCG posuňte močový mechúr dozadu, čím odhalíte semenovod a pravý a ľavý lalok semenných mechúrikov a koagulačné žľazy (SVCG). Úniku tekutiny zabránite upevnením svorky pri koreni SVCG, kde sa semenovod pripája na močovú trubicu. Opatrne vyrežte SVCG, pri zavedenej svorke odstráňte tuk a adnexá, zaveďte lodičku na váženie, odstráňte svorku, odvážte s presnosťou na 0,1 mg a hmotnosť zaznamenajte.

▼M5

— Na pitvu zdvíhača konečníka a bulbokavernóznych svalov (LABC) je potrebné odhaliť svaly a koreň penisu. Svaly zdvíhača konečníka obaľujú hrubé črevo, zatiaľ čo predná časť zdvíhača konečníka a bulbokavernóznych svalov je pripojená k bulbu penisu. Koža a adnexá z perianálnej oblasti siahajúce od koreňa penisu k prednému koncu konečníka sa odstránia. Bulbokavernózne svaly sa postupne oddelia od bulbu penisu a tkanív. Hrubé črevo sa rozreže na dve časti a zdvíhač konečníka spolu s bulbokavernóznymi svalmi možno vyrezať a odstrániť. Zdvíhač konečníka a bulbokavernózne svaly sa zbavia tuku a adnex, odvážia s presnosťou na 0,1 mg a hmotnosť sa zaznamená.

— Po odstránení LABC vidno oblé Cowperove alebo bulbouretrálne žľazy (COW) pri koreni a mierne dorzálne od bulbu penisu. Pitvu je potrebné vykonať opatrne, aby sa predišlo vrúbkovaniu tenkej kapsule a zabránilo úniku tekutiny. Odvážte pár COW s presnosťou na 0,1 mg a hmotnosť zaznamenajte.

— Okrem toho, ak počas pitvy a preparovania dôjde k úniku tekutiny z niektorej žľazy, je potrebné túto skutočnosť uviesť do správy.

55. Ak si hodnotenie každej chemikálie vyžaduje pitvu viacerých zvierat, ako je primerané v jeden deň, začiatok štúdie možno rozložiť na dva po sebe nasledujúce dni, v dôsledku čoho sa pitva a súvisiaca práca rozloží na dva dni. Ak sa práca rozloží týmto spôsobom, v jeden deň sa použije polovica zvierat z každej ošetrenej skupiny.

56. Mŕtve telá sa po pitve vhodným spôsobom zlikvidujú.

PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

57. Údaje sa do správy uvedú jednotlivo (t. j. telesná hmotnosť, hmotnosť akcesórnych tkanív pohlavných orgánov, nepovinné merania a ostatné reakcie a pozorovania) a pre každú skupinu zvierat (stredná a štandardná odchýlka všetkých vykonaných meraní). Údaje sa uvádzajú v tabuľkovej podobe. V údajoch sa uvedie počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat, ktoré boli počas testu nájdené uhynuté alebo vykazovali známky toxicity, opis pozorovaných známok toxicity vrátane času nástupu, trvania a závažnosti.

58. Záverečná správa musí obsahovať tieto informácie:

Testovacie zariadenie

— názov zariadenia, poloha,

— vedúci štúdie a ostatní pracovníci a ich úlohy v rámci štúdie,

— dátum začiatku a konca štúdie, t. j. prvý deň podávania testovanej chemikálie a posledný deň pitvy.

Testovaná chemikália

— zdroj, sériové číslo/číslo šarže, identita, čistota, úplná adresa dodávateľa a charakteristika testovanej chemikálie (chemikálií),

— fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

— podmienky skladovania a spôsob a periodicita prípravy roztokov,

— všetky získané údaje o stabilite,

— všetky analýzy dávkovacích roztokov/suspenzií.

▼**M5**

Nosič

— charakteristika testovaného nosiča (identita, dodávateľ a sériové číslo),

— odôvodnenie výberu nosiča (ak je iný ako voda).

Pokusné zvieratá a postupy chovu zvierat

— použitý druh/kmeň a odôvodnenie výberu,

— zdroj alebo dodávateľ zvierat vrátane úplnej adresy,

— počet a vek dodaných zvierat,

— podmienky umiestnenia (teplota, osvetlenie atď.),

— krmivo (názov, typ, dodávateľ, sériové číslo, obsah a hladiny fytoestrogénov, ak sú známe),

— podstielka (názov, typ, dodávateľ, obsah),

— podmienky v klietkach a počet zvierat na klietku.

Podmienky testu

— vek pri kastrácii a doba aklimatizácie po kastrácii,

— jednotlivé hmotnosti zvierat na začiatku štúdie (s presnosťou na 0,1 g),

— postup randomizácie a záznam o priradení do skupín nosiča, referenčných skupín, skupín, ktorým sa podáva testovaná chemikália, a klietok,

— stredná a štandardná odchýlka telesných hmotností v každej skupine za každý deň váženia počas štúdie,

— odôvodnenie výberu dávky,

— spôsob podávania testovanej chemikálie a odôvodnenie výberu spôsobu expozície,

— pri teste na antiandrogénne účinky, ošetrenie TP (dávka a objem),

— ošetrenie testovanou chemikáliou (dávka a objem),

— čas podania dávky,

— pitevné postupy vrátane metód odkrvenia a anestézie,

— v prípade, že sa analyzujú séra, uvedú sa údaje o metóde. Napríklad, ak sa použije rádioimunologická analýza (RIA), do správy sa uvedie postup RIA, zdroj testovacích súprav pre RIA, dátum spotreby testovacích súprav, postup scintilačnej spektroskopie a štandardizácie.

Výsledky

— denné pozorovania jednotlivých zvierat počas dávkovania vrátane týchto informácií:

— telesné hmotnosti (s presnosťou na 0,1 g),

— klinické príznaky (ak sa pozorujú),

— všetky merania alebo poznámky týkajúce sa spotreby potravy,

— pitevné pozorovania jednotlivých zvierat vrátane týchto informácií:

▼M5

— dátum pitvy,

— ošetrená skupina zvierat,

— identifikácia zvierat,

— prosektor,

— denná doba pitvy a preparovania,

— vek zvierat,

— konečná telesná hmotnosť v čase pitvy s uvedením prípadného štatisticky významného zvýšenia alebo zníženia telesnej hmotnosti,

— poradie odkrvenia a preparovania zvierat v čase pitvy,

— hmotnosť piatich cieľových tkanív, ktoré sú podmienené účinkom androgénov:

— ventrálna prostata (s presnosťou na 0,1 mg),

— semenné mechúriky a koagulačné žľazy vrátane tekutiny (spárované, s presnosťou na 0,1 mg),

— komplex zdvíhača konečníka a bulbokavernóznych svalov (s presnosťou na 0,1 mg),

— Cowperove žľazy (čerstvá hmotnosť - spárované, s presnosťou na 0,1 mg),

— žaluď (čerstvá hmotnosť s presnosťou na 0,1 mg),

— hmotnosť nepovinných tkanív, ak boli vážené:

— pečeň (s presnosťou na 0,1 g),

— obličky (spárované, s presnosťou na 0,1 mg),

— nadobličky (spárované, s presnosťou na 0,1 mg),

— všeobecné poznámky a pripomienky,

— analýza sérových hormónov, ak sa vykonala,

  — sérový LH (nepovinné – ng/ml séra) a

  — sérový T (nepovinné – ng/ml séra),

— všeobecné poznámky a pripomienky.

Zhrnutie údajov

Údaje sa zhrnú do tabuľky, v ktorej sa uvedie veľkosť vzorky jednotlivých skupín, stredná hodnota a štandardná chyba strednej hodnoty alebo štandardná odchýlka. V tabuľkách sa uvedie telesná hmotnosť v čase pitvy, zmeny telesnej hmotnosti od začiatku dávkovania po pitvu, hmotnosť cieľových akcesórnych tkanív pohlavných orgánov a hmotnosti nepovinných orgánov.

Rozbor výsledkov

Analýza výsledkov

59. Telesná hmotnosť a hmotnosť orgánov v čase pitvy by sa mali štatisticky analyzovať s ohľadom na také charakteristiky, ako je homogenita rozptylu s príslušnými transformáciami údajov podľa potreby. Ošetrené skupiny sa porovnajú s kontrolnou skupinou s využitím metód ako ANOVA a následne na základe párového porovnania (napr. Dunnettov jednostranný test) a kritéria pre štatistický rozdiel, napr. $p \leq 0,05$. Určia sa štatisticky významné skupiny. Je však potrebné vyhnúť sa „relatívnej hmotnosti orgánov“ vzhľadom na neplatné štatistické predpoklady tejto manipulácie s údajmi.

▼**M5**

60. Pokiaľ ide o androgénny agonizmus, kontrolou je testovacia skupina, ktorej sa podal iba nosič. Charakteristiky mechanizmu pôsobenia testovanej chemikálie môžu viesť k rôznym relatívnym reakciám u rôznych tkanív, napríklad trenbolón, na ktorý nepôsobí 5α-reduktáza, má silnejšie účinky na LABC a GP ako TP. Štatisticky významné zvýšenie hmotnosti ($p \leq 0,05$) u ktorýchkoľvek dvoch alebo viacerých z piatich cieľových tkanív podmienených účinkom androgénov (VP, LABC, GP, CG a SVCG) je potrebné považovať za pozitívny výsledok na androgénneho agonistu a všetky cieľové tkanivá by mali vykazovať určitú mieru rastu. Kombinované hodnotenie všetkých reakcií akcesórnych tkanív pohlavných orgánov možno vykonať pomocou vhodnej multivariačnej analýzy dát. Týmto spôsobom možno analýzu zdokonaliť, najmä v prípadoch, keď sa štatisticky významná reakcia pozoruje iba u jedného tkaniva.

61. Pokiaľ ide o androgénny antagonizmus, kontrolou je testovacia skupina, ktorej sa podal referenčný androgén (iba testosterón propionát). Charakteristiky mechanizmu pôsobenia testovanej chemikálie môžu viesť k rôznym relatívnym reakciám u jednotlivých tkanív, napríklad inhibítory 5α-reduktázy, ako je finasterid, majú výraznejšie účinky na ventrálnu prostatu ako iné tkanivo v porovnaní so silnými antagonistami AR, ako je flutamid. Štatisticky významné zníženie hmotnosti ($p \leq 0,05$) u ktorýchkoľvek dvoch alebo viacerých z piatich cieľových tkanív podmienených účinkom androgénov (VP, LABC, GP, CG a SVCG) v porovnaní s prípadom, keď bol zvieratám podaný iba TP, je potrebné považovať za pozitívny výsledok na androgénneho antagonistu a všetky cieľové tkanivá by mali vykazovať určitú mieru úbytku hmotnosti. Kombinované hodnotenie všetkých reakcií akcesórnych tkanív pohlavných orgánov možno vykonať pomocou vhodnej multivariačnej analýzy dát. Týmto spôsobom možno analýzu zdokonaliť, najmä v prípadoch, keď sa štatisticky významná reakcia pozoruje iba v prípade jedného tkaniva.

62. Údaje sa zhrnú do tabuľky, v ktorej sa uvedie stredná hodnota a štandardná chyba strednej hodnoty (štandardná odchýlka je tiež prípustná) a veľkosť vzorky jednotlivých skupín. Zahrnú sa aj tabuľky jednotlivých údajov. Jednotlivé hodnoty, stredná hodnota, hodnoty SE (SD) a CV pre kontrolné údaje sa preskúmajú s cieľom určiť, či spĺňajú prípustné kritériá konzistentnosti s očakávanými historickými hodnotami. Hodnoty CV, ktoré presahujú hodnoty CV uvedené v tabuľke 1 (pozri odseky 25 a 26) pre hmotnosť jednotlivých orgánov, určia, či sa v dátových záznamoch alebo údajoch vyskytli chyby, alebo či laboratórium zatiaľ nevie presne vypreparovať tkanivá podmienené účinkom androgénov a je potrebná ďalšia odborná príprava/prax. Vo všeobecnosti sú hodnoty CV (štandardná odchýlka delené stredná hmotnosť orgánu) opakovateľné rôznymi laboratóriami a v rámci rôznych štúdií. Uvedené údaje by mali zahŕňať prinajmenšom hmotnosť ventrálnej prostaty, semenných mechúrikov, zdvíhača konečníka a bulbokavernóznych svalov, Cowperových žliaz, žalúdka, pečene, telesnú hmotnosť a zmenu telesnej hmotnosti od začiatku dávkovania po pitvu. Možno uviesť aj údaje po úprave kovariancie vzhľadom na telesnú hmotnosť, nemali by sa však uvádzať namiesto neupravených údajov. Okrem toho, ak sa v žiadnej skupine nepozoruje oddelenie predkožky (PPS), výskyt PPS sa zaznamená a štatisticky porovná s kontrolnou skupinou na základe Fisherovho presného testu.

▼**M5**

63. Pri overovaní dátových záznamov v počítači s pôvodnými kartami údajov je v záujme presnosti potrebné dôkladne preskúmať hodnoty hmotnosti orgánov, ktoré nie sú z biologického hľadiska vierohodné, alebo sa líšia viac ako o tri štandardné odchýlky od stredných hodnôt danej ošetrenej skupiny, a môže byť potrebné ich vyradiť ako pravdepodobne chybné údaje.

64. Porovnanie výsledkov štúdie s hodnotami CV podľa OECD (v tabuľke 1) často predstavuje dôležitý krok v rámci interpretácie validity výsledkov štúdie. Historické údaje o kontrolných skupinách, ktorým sa podal nosič, sa uchovávajú v laboratóriu. V laboratóriu sa uchovávajú aj historické údaje o reakciách na pozitívne referenčné chemikálie, ako je TP a FT. Laboratóriá môžu zároveň pravidelne testovať reakciu na známych slabých androgénnych agonistov a antagonistov a uchovávať tieto údaje. Tieto údaje možno porovnať s dostupnými údajmi OECD, aby sa zabezpečila dostatočná štatistická presnosť a významnosť metód laboratória.

▼**M5**

Dodatok 1

VYMEDZENIA POJMOV

Androgénny je pojem používaný na opísanie kladného účinkuna rast tkanív závislých od androgénu.

Antiandrogénny je schopnosť chemikálie potlačiť pôsobenie testosterón-propionátu na organizmus cicavca.

Chemikália znamená látku alebo zmes.

Dátum narodenia je postnatálny deň 0.

Dávka je množstvo podanej testovanej chemikálie. V prípade Hershbergerovho biologického testu sa dávka vyjadruje ako hmotnosť testovanej chemikálie na jednotku telesnej hmotnosti pokusného zvieraťa na deň (napr. mg/kg telesnej hmotnosti/deň).

Dávkovanie je všeobecný pojem, ktorý zahŕňa dávku, frekvenciu a trvanie podávania dávok.

Moribundný je pojem používaný na opísanie zvieraťa v stave umierania, t. j. blízko stavu smrti.

Postnatálny deň X je X-tý deň života po dni narodenia.

Citlivosť je schopnosť testovacej metódy správne určiť chemikálie s vlastnosťami, ktoré sa testujú.

Špecifickosť je schopnosť testovacej metódy správne určiť chemikálie bez vlastností, ktoré sa testujú.

Testovaná chemikália znamená akúkoľvek látku alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

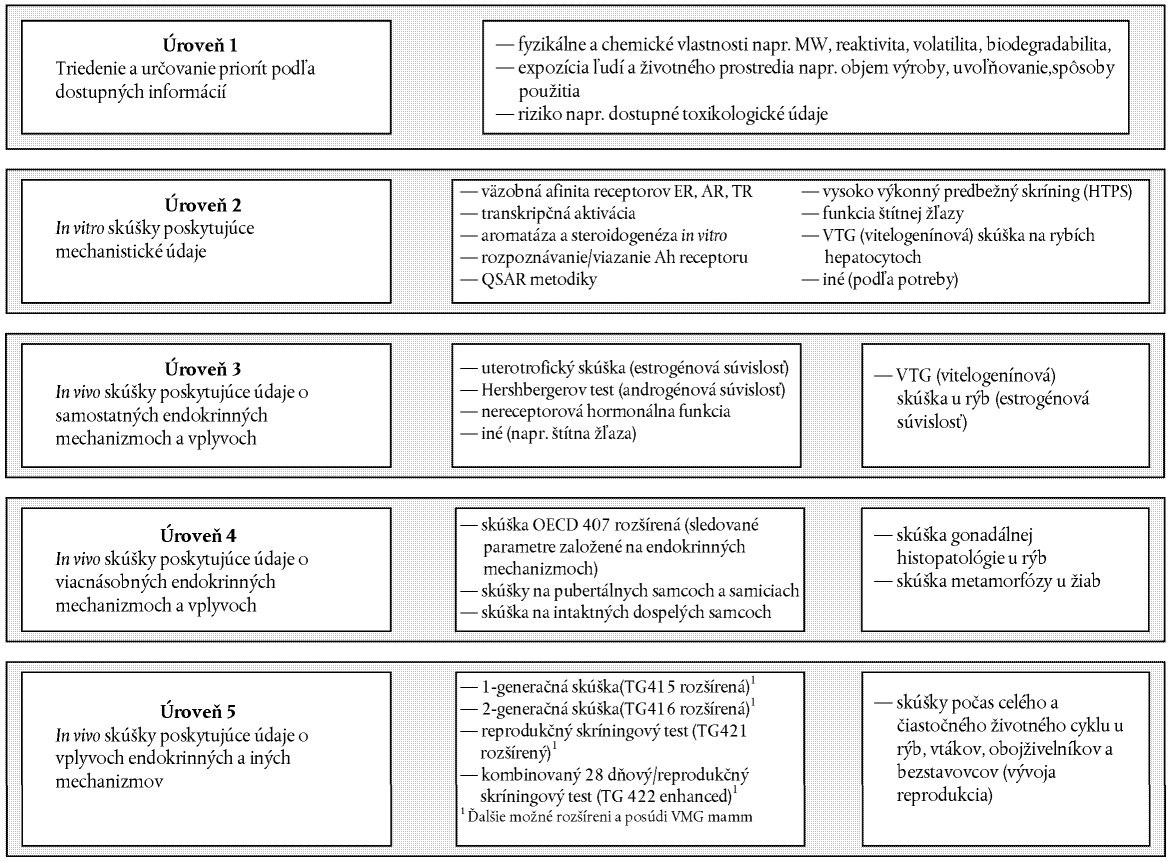
Validácia je vedecký postup určený na charakterizovanie prevádzkových požiadaviek a obmedzení testovacej metódy a na preukázanie jej spoľahlivosti a významu pre konkrétny účel.

▼M5

Dodatok 2

Poznámka: Dokument vypracoval Sekretariát programu na vypracovanie pokynov k testovaniu na základe dohody zo 6. zasadnutia pracovnej skupiny EDTA

Koncepčný rámec OECD na testovanie a hodnotenie chemikálií ako endokrinných disruptorov



VMG mamm: Skupina pre riadenie validácie testovania a posudzovania cicavcov

02008R0440 — SK — 16.10.2019 — 008.001 — 934

▼**M5**

POZNÁMKY K RÁMCU

Poznámka 1: Vstup na všetkých úrovniach a výstup na všetkých úrovniach je možný a závisí od povahy existujúcich informačných potrieb na účely posúdenia nebezpečnosti a rizík.

Poznámka 2: Na úrovni 5 by ekotoxikológia mala zahŕňať sledované parametre, ktoré indikujú mechanizmy nepriaznivých účinkov a potenciálne poškodenie populácie.

Poznámka 3: Ak multimodálny model zahŕňa viacero testov jedného sledovaného parametra, daný model nahradí používanie týchto testov jedného sledovaného parametra.

Poznámka 4: Každá chemikália sa posudzuje jednotlivo po zohľadnení všetkých dostupných informácií a so zreteľom na funkciu rámcových úrovní.

Poznámka 5: Rámec sa v súčasnosti nepovažuje za úplný. Na úrovniach 3, 4 a 5 zahŕňa testy, ktoré sú buď dostupné, alebo u ktorých prebieha validácia. Pokiaľ ide o testy, u ktorých prebieha validácia, sú zahrnuté predbežne. Po vypracovaní a validácii sa formálne pridajú do rámca.

Poznámka 6: Úroveň 5 zahŕňa aj iné ako konečné testy. Testy zahrnuté do tejto úrovne majú prispieť k všeobecnému posúdeniu nebezpečnosti a rizík.

LITERATÚRA

1. OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10. - 11. marec 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 a Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. In: *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 5a-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, Paríž.

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. Pozri oddiel 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. Smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2010 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely (Ú. v. EÚ L 276, 20.10.2010, s. 33).

27. Nasledujúce kapitoly tejto prílohy:

B.1a, Akútna orálna toxicita – metóda stabilnej dávky

B.1b, Akútna orálna toxicita – metóda triedy akútnej toxicity

▼M5

B.56. **ROZŠÍRENÁ JEDNOGENERAČNÁ ŠTÚDIA REPRODUKČNEJ TOXICITY**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 443 (2012). Založená je na návrhu rozšírenej jednogeneračnej reprodukčnej štúdie vývojového štádia F_1 Medzinárodného inštitútu ILSI (International Life Science Institute – ILSI) – Inštitútu pre vedecký výskum zdravia a životného prostredia (Health and Environmental Sciences Institute – HESI), technického výboru pre hodnotenie bezpečnosti poľnohospodárskych chemických látok (Agricultural Chemical Safety Assessment – ACSA Technical Committee), ako bol publikovaný v práci Coopera a kolektívu v roku 2006 (1). V návrhu štúdie sa vykonali viaceré zlepšenia a vyjasnenia s cieľom zabezpečiť pružnosť a zdôrazniť význam začatia práce s existujúcimi znalosťami, s využitím pozorovaní počas života pri riadení a prispôsobovaní testovania. Táto testovacia metóda poskytuje podrobný opis prevádzkového vykonania rozšírenej jednogeneračnej štúdie reprodukčnej toxicity. Testovacia metóda opisuje tri kohorty zvierat generácie F_1:

kohorta 1: posudzujú sa sledované reprodukčné/vývojové parametre; táto kohorta sa môže rozšíriť tak, aby zahrnula aj generáciu F_2.

kohorta 2: posudzuje sa potenciálny účinok vystavenia chemikáliám na vyvíjajúci sa nervový systém.

kohorta 3: posudzuje sa potenciálny účinok vystavenia chemikáliám na vyvíjajúci sa imunitný systém.

2. Rozhodnutia o tom, či posudzovať druhú generáciu a či vynechať kohortu vývojovej neurotoxicity a/alebo vývojovej imunotoxicity, musia byť založené na existujúcich poznatkoch o chemikálii, ktorá sa hodnotí, ako aj na potrebách rôznych regulačných orgánov. Účelom tejto testovacej metódy je poskytnúť podrobné informácie o tom, ako sa dá štúdia vykonať, a určiť, ako sa má každá kohorta hodnotiť.

3. Postup rozhodovania o vnútornom spustení vzniku 2. generácie je opísaný v usmerňovacom dokumente OECD 117 (39) pre regulačné orgány, ktoré využívajú vnútorné spúšťače.

ÚVODNÉ ÚVAHY A CIELE

4. Hlavným cieľom rozšírenej jednogeneračnej štúdie reprodukčnej toxicity je zhodnotiť konkrétne vývojové štádiá, ktorých sa netýkali iné druhy štúdií toxicity, a testovať účinky, ktoré sa môžu vyskytnúť v dôsledku prenatálneho a postnatálneho vystavenia chemikáliám. Pre reprodukčné cieľové body sa predpokladá ako prvý krok a vždy, keď je to možné, použitie informácií zo štúdií s opakovanými dávkami (vrátane skríningových štúdií reprodukčnej toxicity, napríklad OECD TG 422 (32)) alebo z krátkodobých skríningových testov endokrinných disruptorov (napríklad uterotropický test – testovacia metóda B.54 (36) a Hershbergerov test – testovacia metóda B.55 (37)) na zisťovanie účinkov na reprodukčné orgány samcov a samíc. Môže to zahŕňať spermatogenézu (testikulárnu histopatológiu) u samcov a estrálny cyklus, počty folikulov/dozrievanie oocytov a ovariálnu integritu (histopatológiu) u samíc. Rozšírená jednogeneračná štúdia reprodukčnej toxicity potom slúži ako test sledovaných reprodukčných parametrov, ktoré si vyžadujú interakciu samcov so samicami, samíc so zárodkom, samíc s potomstvom a generáciu F_1 až do dosiahnutia pohlavnej zrelosti (pozri usmerňovací dokument OECD 151 podporujúci túto testovaciu metódu (40)).

▼**M5**

5. Táto testovacia metóda je navrhnutá tak, aby poskytla hodnotenie prenatálnych a postnatálnych účinkov chemikálií na vývoj, ako aj dôkladné hodnotenie systémovej toxicity u gravidných samíc a samíc v laktácii a u mladého a dospelého potomstva. Predpokladá sa, že podrobným vyšetrovaním kľúčových sledovaných vývojových parametrov, ako je životaschopnosť potomstva, neonatálne zdravie, stav vývoja pri narodení a fyzický a funkčný vývoj do dospelosti, sa určia konkrétne cieľové orgány v potomstve. Štúdia okrem toho poskytne a/alebo potvrdí informácie o účinkoch testovaných chemikálií na integritu a činnosť reprodukčných systémov dospelých samcov a samíc. Posudzujú sa konkrétne, ale nie výlučne, tieto parametre: funkcia pohlavných žliaz, estrálny cyklus, dozrievanie spermií z chvostovej časti nadsemenníkov, rozmnožovacie správanie, počatie, gravidita, pôrod a laktácia. Informácie získané z posudzovania vývojovej neurotoxicity a vývojovej imunotoxicity budú navyše charakterizovať potenciálne účinky v týchto systémoch. Údaje získané z týchto testov umožnia stanovenie hladín bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL), hladín s najnižším pozorovateľným nepriaznivým účinkom (LOAEL) a/alebo referenčných dávok pre rôzne sledované parametre a/alebo sa použijú na charakterizovanie účinkov zistených v predchádzajúcich štúdiách s opakovanými dávkami a/alebo poslúžia ako návod pre následné testovanie.

6. Na obrázku 1 je znázornený schematický náčrt protokolu. Testovaná chemikália sa podáva sústavne v odstupňovaných dávkach viacerým skupinám sexuálne zrelých samcov a samíc. Tejto generácii rodičov (P) sa látka podáva počas stanoveného obdobia pred párením (zvoleného na základe dostupných informácií o testovanej chemikálii, ale v dĺžke najmenej dva týždne) a počas dvojtýždňového obdobia párenia. Samcom generácie P sa látka ďalej podáva najmenej do odstavenia generácie F_1. Podávanie látky trvá najmenej 10 týždňov. Môže trvať aj dlhšie, ak je potrebné objasniť účinky na reprodukciu. Samiciam generácie P sa látka ďalej podáva počas gravidity a laktácie až do ukončenia po odstavení vrhu (t. j. 8 – 10 týždňov podávania). Potomstvu generácie F_1 sa testovaná chemikália ďalej podáva od odstavenia po dospelosť. Ak sa posudzuje aj druhá generácia (pozri usmerňovací dokument OECD 117 (39)), podávanie látky potomstvu generácie F_1 bude pokračovať až do odstavenia generácie F_2, alebo do ukončenia štúdie.

7. Klinické pozorovania a patologické vyšetrenia sa vykonajú na všetkých zvieratách na príznaky toxicity s osobitným dôrazom na integritu a činnosť samčích a samičích reprodukčných systémov a na zdravie, rast, vývoj a činnosť potomstva. Pri odstavení sa potomstvo rozdelí na jednotlivé skupiny (kohorta 1 – 3, pozri odseky 33 a 34 a obrázok 1) pre ďalšie vyšetrovanie vrátane sexuálneho dozrievania, integrity a činnosti reprodukčných orgánov, sledovaných neurologických parametrov a parametrov správania a imunitných funkcií.

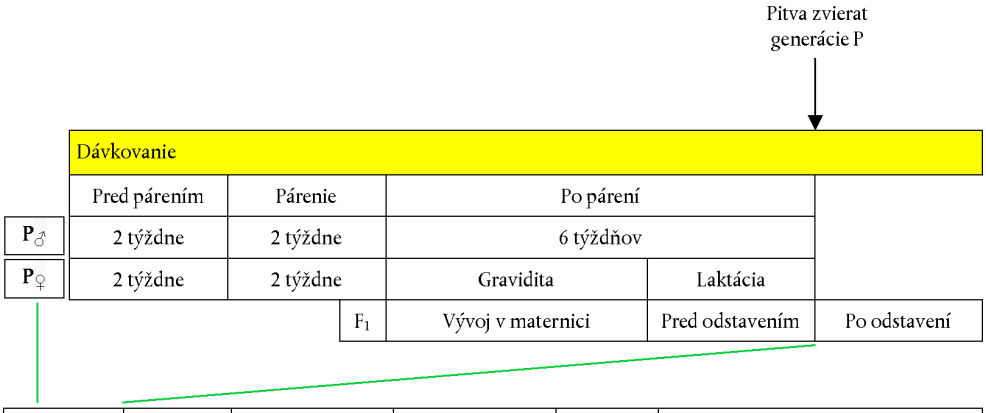
8. Pri vykonávaní štúdie je potrebné sa riadiť zásadami a hľadiskami uvedenými v usmerňovacom dokumente OECD č. 19 Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation (34).

▼M5

9. Ak bude k dispozícii dostatočný počet štúdií na to, aby sa zistil vplyv plánu tejto novej štúdie, testovacia metóda sa podrobí preskúmaniu a v prípade potreby bude revidovaná na základe získaných skúseností.

Obrázok 1

Schéma rozšírenej jednogeneračnej štúdie reprodukčnej toxicity



Generácia rodičov	Kohorta	Účel určenia	Zvieratá/kohorta	Pohlavná zrelosť	Približný vek pri pitve (v týždňoch)
Cieľ je 20 vrhov na skupinu	1A	Reprodukcia	20 M + 20 Ž	Áno	13
	1B	Reprodukcia	20 M + 20 Ž	Áno	14 alebo 20-25, v prípade vyvolania účinkov
	2A	Neurotoxicita	10 M + 10 Ž@	Áno	11-12
	2B	Neurotoxicita	10 M + 10 Ž @	Nie	3
	3	Imunotoxicita	10 M + 10Ž @	Áno	8
	Nadbytok	Náhradníci		Nie	3

@ eden na vrh a zastupujúci celkových 20 vrhov, ak je to možné

OPIS METÓDY/PRÍPRAVY NA TEST

Zvieratá

Výber druhu a kmeňa zvierat

10. Voľbu druhov pre testy reprodukčnej toxicity je potrebné dôkladne zvážiť s ohľadom na všetky dostupné informácie. Vzhľadom na rozsah základných údajov a porovnateľnosť testov všeobecnej toxicity je však bežne preferovaným druhom potkan a kritériá a odporúčania uvedené v tejto testovacej metóde sa vzťahujú na tento druh. Ak sa použije iný druh, je potrebné uviesť odôvodnenie a vykonať príslušné úpravy protokolu. Kmene s nízkou plodnosťou, alebo o ktorých je známe, že majú vysoký výskyt spontánnych vývojových porúch, sa nemajú používať.

Vek, telesná hmotnosť a kritériá použitia

11. Používať sa musia zdravé rodičovské zvieratá, ktoré neboli podrobené predchádzajúcim pokusom. Študovať je potrebné samcov aj samice, pričom samice by musia byť virgínne a negravidné. Zvieratá generácie P musia byť sexuálne zrelé, podobnej hmotnosti (v rámci pohlavia) na začiatku podávania látky, podobného veku (približne 90 dní) pri párení a mali by byť reprezentatívnymi predstaviteľmi skúmaného druhu a kmeňa. Zvieratá sa majú po príchode aklimatizovať aspoň 5 dní. Zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a testovaných skupín tak, aby výsledkom boli porovnateľné stredné hodnoty hmotnosti jednotlivých skupín (t. j. ± 20 % strednej hodnoty).

▼M5

Podmienky pre umiestnenie a kŕmenie

12. Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá má byť 22 °C (± 3 °C). Relatívna vlhkosť má byť 30 – 70 %, pričom ideálny rozsah je 50 – 60 %. Umelé osvetlenie má byť zapnuté 12 hodín a 12 hodín má byť tma. Používať sa môže bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Veľkú pozornosť je potrebné venovať obsahu fytoestrogénov v krmive, keďže vysoká úroveň fytoestrogénov v krmive môže ovplyvniť niektoré sledované reprodukčné parametre. Odporúčajú sa normované krmivá s otvorenou receptúrou, v ktorých je obsah estrogénových chemikálií znížený (2) (30). Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zaistenia vhodného prídavku testovanej chemikálie pri použití tejto metódy. Obsah, homogénnosť a stabilitu testovanej chemikálie v krmive je potrebné overovať. Potravu a pitnú vodu je potrebné pravidelne analyzovať na obsah kontaminantov. Vzorky každej dávky krmiva používaného počas štúdie sa uchovávajú vo vhodných podmienkach (t. j. zmrazené na – 20 °C) až do vypracovania správy pre prípad, že by si výsledky vyžadovali ďalšiu analýzu zložiek krmiva.

13. Zvieratá sú umiestnené v klietkach v malých skupinách rovnakého pohlavia a rovnakej testovanej skupiny. Môžu byť umiestnené individuálne, aby sa predišlo možným poraneniam (napríklad samce po období párenia). Párenie prebieha vo vhodných klietkach. Po preukázanej kopulácii je potrebné samice, u ktorých sa predpokladá, že sú gravidné, umiestniť oddelene v pôrodných alebo materských klietkach, kde im bude poskytnutý vhodný a stanovený materiál na hniezdenie. Vrhnuté mláďatá sú umiestnené so svojimi matkami až do odstavenia. Zvieratá generácie F_1 sú umiestnené v malých skupinách rovnakého pohlavia a rovnakej testovanej skupiny od odstavenia do ukončenia. Ak je to vedecky odôvodnené, zvieratá môžu byť umiestnené individuálne. Úroveň fytoestrogénov obsiahnutých vo zvolenom materiáli na hniezdenie musí byť minimálna.

Počet a identifikácia zvierat

14. Každá testovaná a kontrolná skupina spravidla pozostáva z dostatočného počtu páriacich sa dvojíc tak, aby výsledkom bolo najmenej 20 gravidných samíc na dávkovú skupinu. Cieľom je dosiahnuť dostatočný počet gravidít, aby sa zabezpečilo zmysluplné hodnotenie potenciálu chemikálie pôsobiť na fertilitu, graviditu a materské správanie generácie P a na rast a vývoj potomstva generácie F_1 od oplodnenia po dosiahnutie zrelosti. Ak sa nedosiahne zamýšľaný počet gravidných zvierat, neznamená to nevyhnutne neplatnosť štúdie, keďže je potrebné každý prípad hodnotiť individuálne a zohľadniť pritom možnú príčinnú súvislosť s testovanou chemikáliou.

15. Každému zvieraťu generácie P sa pred začiatkom podávania dávok pridelí jeho vlastné identifikačné číslo. Ak laboratórne historické údaje naznačujú, že výrazná časť samíc nemusí vykazovať pravidelné (štvordňové alebo päťdňové) estrálne cykly, odporúča sa posúdiť estrálne cykly pred začiatkom podávania látky. Alternatívne sa môže skupina zväčšiť tak, aby bolo zabezpečené, že v každej skupine bude mať na začiatku testovania pravidelné (štvordňové alebo päťdňové) estrálne cykly najmenej 20 samíc. Každé mláďa z potomstva generácie F_1 sa jednoznačne identifikuje pri prvom vyšetrení v 0. alebo 1. postantálny deň. Pre všetky zvieratá generácie F_1 a podľa potreby aj zvieratá generácie F_2 sa záznamy s uvedením vrhu, z ktorého pochádzajú, uchovajú počas celého trvania štúdie.

▼M5

Testovaná chemikália

Dostupné informácie o testovanej chemikálii

16. Prehľad existujúcich informácií je dôležitý pre prijímanie rozhodnutí o spôsobe podávania, voľbe nosiča, výbere druhu zvieraťa, voľbe dávok a prípadných úpravách harmonogramu dávkovania. Preto je potrebné pri plánovaní rozšírenej jednogeneračnej štúdie reprodukčnej toxicity brať do úvahy všetky dôležité dostupné informácie o testovanej chemikálii, t. j. fyzikálno-chemické, toxikokinetické (vrátane metabolizmu konkrétneho druhu), toxikodynamické vlastnosti, vzťahy medzi štruktúrou a aktivitou, metabolické procesy in vitro, výsledky predchádzajúcich štúdií toxicity a relevantné informácie o štrukturálnych analógoch. Predbežné informácie o absorpcii, distribúcii, metabolizme a eliminácii, ako aj o bioakumulácii sa dajú odvodiť z chemickej štruktúry, fyzikálno-chemických vlastností, miery viazania proteínov plazmy alebo z toxikokinetických štúdií, zatiaľ čo výsledky štúdií toxicity poskytujú doplňujúce informácie, napríklad o hladine bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL), o metabolizme alebo indukcii metabolizmu.

Posúdenie toxikokinetických údajov

17. Toxikokinetické údaje z predchádzajúcich štúdií venovaných určovaniu rozsahu dávky alebo iných štúdií sa síce nevyžadujú, sú však nesmierne užitočné pri navrhovaní plánu štúdie, voľbe hladiny dávky a interpretácii výsledkov. Zvlášť prínosné sú údaje, ktoré: 1) verifikujú vystavenie vyvíjajúcich sa plodov a mláďat testovanej chemikálii (alebo príslušných metabolitov), 2) poskytujú odhad vnútornej dozimetrie a 3) hodnotia potenciálnu saturáciu kinetických procesov v závislosti od dávky. Zohľadniť treba aj ďalšie toxikokinetické údaje, ako sú profily metabolitov, priebeh závislosti koncentrácie od času atď., pokiaľ sú k dispozícii. Doplňujúce toxikokinetické údaje sa dajú získať aj v priebehu hlavnej štúdie za predpokladu, že to neprekáža pri získavaní a interpretácii hlavných sledovaných parametrov štúdie.

Ako všeobecné usmernenie platí, že pri plánovaní rozšírenej jednogeneračnej štúdie reprodukčnej toxicity sú užitočné tieto súbory toxikokinetických údajov:

— v pokročilom období gravidity (napríklad 20. deň gravidity) – materská krv a krv plodu,

— uprostred obdobia laktácie (10. postnatálny deň) – materská krv, krv mláďaťa a/alebo mlieko,

— obdobie krátko po odstavení (napríklad 28. postnatálny deň) – vzorky krvi odstaveného mláďaťa.

Pri určovaní konkrétnych analytov (napríklad parentálnej, pôvodnej chemikálie a/alebo metabolitov) a plánu odberu vzoriek je potrebné uplatniť pružnosť. Napríklad počet a načasovanie odberov vzoriek v určený deň bude závisieť od priebehu expozície a od predchádzajúcich znalostí o toxikokinetických vlastnostiach negravidných zvierat. V prípade dietetických štúdií postačuje odber vzoriek každý určený deň v jednom stabilnom čase, keďže dávkovanie pomocou sondy môže zaručiť dodatočné časy odberu vzoriek s cieľom získať lepší odhad rozsahu vnútorných dávok. V žiadny deň odberu vzoriek však nie je potrebné vytvárať plne koncentrovaný časový priebeh. V prípade potreby sa krv pre plodové a neonatálne analýzy môže odoberať vo vrhoch podľa pohlavia.

▼M5

Spôsob podávania

18. Pri výbere spôsobu podávania je potrebné zohľadniť spôsoby, ktoré sú najdôležitejšie z hľadiska expozície ľudí. Hoci protokol je vypracovaný pre prípad podávania testovanej chemikálie v krmive, môže sa upraviť na podávanie inými cestami (v pitnej vode, sondou, inhaláciou, dermálne), v závislosti od vlastností chemikálie a požadovaných informácií.

Voľba nosiča

19. V prípade potreby sa testovaná chemikália rozpustí alebo rozptýli vo vhodnom nosiči. Odporúča sa, aby sa podľa možnosti najskôr zvážilo použitie vodného roztoku/suspenzie, potom roztoku/suspenzie v oleji (napríklad kukuričný olej). Pre iné nosiče ako voda majú byť známe toxické vlastnosti nosiča. Vyhnúť sa treba používaniu nosičov s potenciálnou vnútornou toxicitou (napríklad acetón, dimetylsulfoxid – DMSO). Je potrebné určiť stabilitu testovanej chemikálie v nosiči. Ak sa na uľahčenie podávania dávky používa nosič alebo iné aditívum, je potrebné venovať pozornosť týmto vlastnostiam: vplyv nosiča na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo retenciu testovanej chemikálie, vplyv na chemické vlastnosti testovanej chemikálie, ktoré môžu zmeniť jej toxické vlastnosti, a vplyv na spotrebu potravy alebo vody alebo nutričný stav zvierat.

Výber dávky

20. Štúdia by spravidla mala zahŕňať najmenej tri hladiny dávky a súbežnú kontrolu. Pri voľbe vhodných dávok výskumník zváži všetky dostupné informácie vrátane informácií o podávaní dávok z predchádzajúcich štúdií, toxikokinetických údajov o gravidných alebo negravidných zvieratách, rozsahu laktačného prenosu a odhadov expozície ľudí. Ak sú k dispozícii toxikokinetické údaje, ktoré ukazujú, že saturácia toxikokinetických procesov závisí od veľkosti dávky, je potrebné dať pozor, aby sa predišlo vysokým hladinám dávok, ktoré zjavne vykazujú saturáciu, samozrejme za predpokladu, že očakávané expozície ľudí ležia výrazne pod bodom saturácie. V takých prípadoch by najvyššia hladina dávky mala byť na úrovni zlomového bodu prechodu k nelineárnemu toxikokinetickému správaniu, alebo iba tesne nad týmto bodom.

21. Ak chýbajú príslušné toxikokinetické údaje, hladiny dávok je založená na toxických účinkoch, pokiaľ nie je obmedzená fyzikálnou/chemickou podstatou testovanej chemikálie. Ak sú hladiny dávok založené na toxicite, najvyššia dávka sa vyberie tak, aby indukovala systémovú toxicitu, ale nespôsobovala uhynutie alebo vážne utrpenie zvierat.

22. Vyberá sa klesajúca postupnosť hladiny dávok s cieľom preukázať akúkoľvek závislosť účinku od dávky a stanoviť hodnotu hladín bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL), alebo dávky v blízkosti hranice zistenia, čo by umožnilo odvodenie referenčnej dávky pre najcitlivejšie sledované parametre. Aby sa predišlo veľkému rozstupu medzi hladinami NOAEL a hladinami s najnižším pozorovateľným nepriaznivým účinkom (LOAEL), často sú najvhodnejšie dvojúrovňové alebo štvorúrovňové intervaly. Pridanie štvrtej testovacej skupiny je často výhodnejšie než používanie veľmi veľkého intervalu (napríklad viac ako faktor 10) medzi hladinami dávok.

23. So zvieratami v kontrolnej skupine sa musí zaobchádzať tak isto ako so zvieratami v testovaných skupinách, s výnimkou podania testovanej látky. Táto skupina je netestovaná alebo zdanlivo testovaná kontrolná skupina, prípadne kontrolná skupina s podávaním nosiča, ak sa používa nosič na podávanie testovanej látky. Ak sa pri podávaní testovanej látky používa nosič, kontrolná skupina ho dostane v najvyššom objeme, v akom je použitý v testovaných skupinách.

▼M5

Limitný test

24. Ak neexistuje dôkaz toxicity pri dávke najmenej 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň v rámci štúdie s opakovanými dávkami, alebo ak sa toxicita neočakáva na základe údajov štruktúrne a/alebo metabolicky príbuzných chemikálií, ktoré vykazujú podobnosť metabolických vlastností in vivo/in vitro, nemusí byť nevyhnutné vykonať štúdiu s použitím viacerých hladín dávky. V takých prípadoch sa rozšírená jednogeneračná štúdia reprodukčnej toxicity môže vykonať s použitím kontrolnej skupiny a jednej dávky najmenej 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň. Ak sa však pri tejto limitnej dávke zistí dôkaz reprodukčnej alebo vývojovej toxicity, budú potrebné ďalšie štúdie pri nižších hladinách dávky, aby sa stanovila hodnota NOAEL. Tieto úvahy o limitnom teste sa uplatňujú iba v prípade, keď expozícia ľudí neindikuje potrebu skúmania pri vyššej hladine dávky.

POSTUPY

Expozícia potomstva

25. Preferovanou metódou podávania látky je expozícia prostredníctvom krmiva. Ak sa vykonávajú štúdie s použitím sondy, je potrebné poznamenať, že mláďatá budú testovanú chemikáliu bežne prijímať iba nepriamo prostredníctvom mlieka, až kým sa im po odstavení nezačne dávka podávať priamo. V štúdiách, pri ktorých sa látka podáva v krmive alebo pitnej vode, mláďatá dostanú dodatočne testovanú látku priamo, keď začnú jesť samostatne počas posledného týždňa laktácie. Ak je vylučovanie testovanej chemickej látky v mlieku slabé a neexistuje dôkaz o sústavnej expozícii potomstva, treba zvážiť úpravy plánu štúdie. V týchto prípadoch je potrebné uvažovať o priamom podávaní dávky mláďatám počas obdobia laktácie na základe dostupných toxikokinetických informácií, toxicity potomstva alebo zmien biomarkerov (3) (4). Pred začatím realizácie štúdií s priamym podávaním dávok dojčeným mláďatám je potrebné dôkladne zvážiť všetky prínosy a nevýhody (5).

Dávkovací plán a podávanie dávok

26. Niektoré informácie o estrálnom cykle, histopatológii reprodukčného traktu samcov a samíc a o testikulárnej/epididymálnej analýze spermií môžu byť dostupné z predchádzajúcich štúdií toxicity s opakovanými dávkami v primeranom trvaní. Cieľom testovania v období pred párením v rámci rozšírenej jednogeneračnej štúdie reprodukčnej toxicity je preto zistenie účinkov na funkčné zmeny, ktoré môžu ovplyvňovať správanie pri párení a oplodnenie. Testovanie v období pred párením musí byť dostatočne dlhé, aby sa dosiahli stabilné podmienky expozície samcov a samíc generácie P. Vo väčšine prípadov sa za primerané považuje dvojtýždňové testovanie v období pred párením pre obe pohlavia. U samíc to predstavuje 3 – 4 úplné estrálne cykly a to by malo byť dostatočné na zistenie akýchkoľvek nepriaznivých účinkov na tieto cykly. U samcov to zodpovedá času potrebnému na epididymálny prechod dozrievajúcich spermií a malo by to umožniť zistenie post-testikulárnych účinkov na spermie (počas záverečných štádií vzniku spermií a ich epididymálneho dozrievania) pri párení. V čase ukončenia, keď je naplánovaná testikulárna a epididymálna histopatológia a analýza parametrov spermií, samce generácie P a F_1 budú exponované najmenej po dobu jedného úplného procesu spermatogenézy ((6), (7), (8), (9) a usmerňovací dokument OECD 151 (40)).

▼**M5**

27. Scenáre expozície pred párením sa môžu upraviť, ak v predchádzajúcich štúdiách bola jednoznačne zistená testikulárna toxicita (zhoršenie spermatogenézy) alebo účinky na integritu a funkciu spermií. Podobne v prípade samíc môžu známe účinky testovanej chemikálie na estrálny cyklus a teda na sexuálnu vnímavosť byť dôvodom na odlišné scenáre expozície pred párením. V osobitných prípadoch môže byť prijateľné, aby sa testovanie samíc generácie P začalo až po získaní sterov pozitívnych na spermie (pozri usmerňovací dokument OECD 151 (40)).

28. Po stanovení obdobia podávania dávok pred párením sa testovaná chemikália zvieratám podáva nepretržite až do pitvy. Všetkým zvieratám sa dávky podávajú rovnakou metódou. Podávanie dávok prebieha počas dvojtýždňového obdobia párenia a v prípade samíc generácie P počas gravidity a laktácie až do dňa ukončenia po odstavení. Samce sa testujú rovnakým spôsobom až do ukončenia v čase, keď sa zvieratá generácie F_1 odstavia. Pokiaľ ide o pitvu, prioritou sú samice, ktoré sa pitvú v rovnaký/približne rovnaký deň laktácie. Pitva samcov sa môže rozložiť na viacero dní v závislosti od možností laboratória. Ak sa s priamym podávaním dávok vybraným samcom a samiciam generácie F_1 nezačalo počas obdobia laktácie, začne sa s tým po odstavení a pokračuje až do plánovanej pitvy, v závislosti od zaradenia do kohorty.

29. Pre chemikálie, ktoré sú podávané ako súčasť krmiva alebo pitnej vody, je dôležité zaistiť, aby množstvo obsiahnutej testovanej chemikálie neinterferovalo s normálnou nutričnou hodnotou alebo vodnou rovnováhou. Ak je testovaná chemikália podávaná v krmive, je možné použiť buď konštantnú dietetickú koncentráciu (ppm), alebo konštantnú hladinu dávkovania s ohľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa, pričom zvolenú možnosť je potrebné uviesť.

30. Ak je testovaná chemikália podávaná prostredníctvom sondy, objem tekutiny podanej naraz by spravidla nemal presiahnuť 1 ml/100 g telesnej hmotnosti (maximum pre olej, napríklad kukuričný olej, je 0,4 ml/100 g telesnej hmotnosti). S výnimkou dráždivých alebo žieravých chemikálií, ktoré zvyčajne pri vyšších koncentráciách spôsobia zhoršenie účinkov, variabilita v testovanom objeme sa minimalizuje tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem vo všetkých úrovniach dávky. Látka sa podáva každý deň v približne rovnakých časoch. Dávka pre každé zviera je spravidla založená na najaktuálnejšom určení individuálnej telesnej hmotnosti a upravovaná najmenej raz za týždeň u dospelých samcov a dospelých negravidných samíc a každé dva dni u gravidných samíc a zvierat generácie F_1, ak sa podáva pred odstavením a počas 2 týždňov po odstavení. Ak toxikokinetické údaje ukazujú nízky placentárny prenos testovanej chemikálie, môže byť potrebné upraviť podávanie prostredníctvom sondy počas posledného týždňa gravidity, aby sa predišlo podávaniu nadmerne toxickej dávky samici. V deň pôrodu sa samiciam nepodáva látka prostredníctvom sondy, ani žiadnym iným spôsobom, pri ktorom je potrebné so zvieraťom manipulovať. V tento deň sa vynechá podávanie testovanej chemikálie a preferuje sa nerušený priebeh pôrodu.

▼M5

Párenie

31. Každá samica generácie P sa umiestni s jedným náhodne vybraným, nespriazneným samcom z rovnakej dávkovej skupiny (párenie 1:1), až kým sa nepozoruje dôkaz kopulácie alebo kým neuplynú 2 týždne. Ak je nedostatok samcov, napríklad v dôsledku úhynu samca pred párením, môže sa samec, ktorý sa už páril, znovu páriť (1:1) s druhou samicou tak, aby všetky samice absolvovali párenie. Za 0. deň gravidity sa určí deň, keď sa potvrdí dôkaz o párení (zistí sa výskyt vaginálnej zátky alebo spermy). Zvieratá sa oddelia čo najskôr po pozorovaní dôkazu kopulácie. Ak k páreniu nedôjde ani po 2 týždňoch, zvieratá sa oddelia bez ďalšej možnosti párenia. Vzájomne spárené páry je potrebné v údajoch zreteľne identifikovať.

Veľkosť vrhu

32. Na 4. deň po pôrode sa môže upraviť veľkosť každého vrhu elimináciou mláďat, ktoré sú navyše, náhodným výberom tak, aby sa výsledok čo najviac priblížil počtu päť samcov a päť samíc v každom vrhu. Selektívna eliminácia mláďat, napríklad na základe telesnej hmotnosti, nie je vhodná. Ak počet samčích alebo samičích mláďat bráni vytvoreniu vrhu s piatimi mláďatami z každého pohlavia, je prijateľná čiastočná úprava (napríklad šesť samcov a štyri samice).

Výber mláďat pre štúdie po odstavení (pozri obrázok 1)

33. Po odstavení (približne 21. PND) sa zo všetkých dostupných vrhov vyberú mláďatá na ďalšie vyšetrenia, do 20 na každú dávkovú a kontrolnú skupinu, a uchovávajú sa do dosiahnutia pohlavnej zrelosti (pokiaľ sa nevyžaduje skoršie testovanie). Mláďatá sa vyberajú náhodne, s výnimkou zjavne nevyvinutých jedincov (zvieratá s telesnou hmotnosťou o viac ako dvojnásobok hodnoty štandardnej odchýlky nižšou, než je stredná hodnota hmotnosti mláďaťa v príslušnom vrhu), ktorí sa nezahrnú, keďže by zrejme neboli reprezentatívnymi príslušníkmi testovanej skupiny.

Na 21. PND sa vybrané mláďatá generácie F_1 náhodne zaradia do jednej z týchto troch kohort zvierat:

kohorta 1 (1A a 1B) = testovanie reprodukčnej/vývojovej toxicity

kohorta 2 (2A a 2B) = testovanie vývojovej neurotoxicity

kohorta 3 = testovanie vývojovej imunotoxicity

Kohorta 1A: Jeden samec a jedna samica/vrh/skupinu (20/pohlavie/skupinu): prioritný výber pre primárne posúdenie účinkov na reprodukčné systémy a všeobecnej toxicity.

Kohorta 1B: Jeden samec a jedna samica/vrh/skupinu (20/pohlavie/skupinu): prioritný výber pre následné posúdenie reprodukčnej schopnosti páriacich sa zvierat generácie F_1 (pozri usmerňovací dokument OECD 117 (39)) a pre získanie dodatočných histopatologických údajov v prípadoch podozrivých reproduktívnych alebo endokrinných toxických látok, alebo pre prípad, že sú výsledky z kohorty 1A nejednoznačné.

Kohorta 2A: Spolu 20 mláďat na skupinu (10 samcov a 10 samíc na skupinu; jeden samec alebo jedna samica na vrh), určených na neurobehaviorálne testovanie, po ktorom nasleduje neurohistopatologické posudzovanie v dospelosti.

Kohorta 2B: Spolu 20 mláďat na skupinu (10 samcov a 10 samíc na skupinu; jeden samec alebo jedna samica na vrh), určených na neurohistopatologické posudzovanie po odstavení (21. alebo 22. postnatálny deň). Ak počet zvierat nie je dostatočný, uprednostniť treba ich zaradenie do kohorty 2A.

▼M5

Kohorta 3: Spolu 20 mláďat na skupinu (10 samcov a 10 samíc na skupinu; jedno na vrh, ak je to možné). Potrebné môžu byť ďalšie mláďatá z kontrolnej skupiny, aby sa použili ako zvieratá na pozitívnu kontrolu v teste protilátkovej reakcie závislej od T-buniek (T-cell dependant antibody response – TDAR) v 56. (± 3) postnatálny deň.

34. Ak počet mláďat vo vrhu nie je dostatočný na obsadenie všetkých kohort, prednosť má kohorta 1, keďže tá sa môže rozšíriť vznikom generácie F_2. Dodatočné mláďatá sa môžu zaradiť do ktorejkoľvek kohorty v prípade osobitného záujmu, napríklad ak existuje podozrenie, že chemikália je neurotoxická, imunotoxická alebo reprodukčne toxická. Tieto mláďatá sa môžu použiť na vyšetrenia v rôznych časových úsekoch alebo na hodnotenie doplnkových sledovaných parametrov. Mláďatá, ktoré neboli zaradené do kohort, sa podrobia klinickej biochemickej analýze (odsek 55) a makroskopickej pitve (odsek 68).

Druhé párenie zvierat generácie P

35. Druhé párenie sa zvyčajne pre zvieratá generácie P neodporúča, pretože ide na úkor straty dôležitých informácií o počte implantačných miest (a teda straty poimplantačných a perinatálnych údajov) pre prvý vrh. Potrebu verifikovať alebo objasniť účinok na exponované samice by lepšie naplnilo rozšírenie štúdie tak, aby zahŕňala aj párenie generácie F_1. Druhé párenie samcov generácie P s netestovanými samicami však stále predstavuje možnosť objasniť nejednoznačné zistenia alebo podrobnejšie charakterizovať účinky na fertilitu pozorované pri prvom párení.

POZOROVANIA POČAS ŽIVOTA

Klinické pozorovania

36. U zvierat generácie P a vybraných zvierat generácie F_1 sa všeobecné klinické pozorovanie vykonáva raz denne. V prípade podávania dávky prostredníctvom sondy sú klinické pozorovania načasované na dobu pred podávaním a po podávaní dávky (z dôvodu možných príznakov toxicity spojených s maximálnou koncentráciou plazmy). Prípadné zmeny v správaní, príznaky ťažkého alebo dlhotrvajúceho pôrodu a všetky príznaky toxicity sa zaznamenajú. Dvakrát denne, počas víkendu raz denne, sa u všetkých zvierat sleduje silná toxicita, morbidita a mortalita.

37. Okrem toho sa raz týždenne vykonáva podrobnejšie vyšetrenie všetkých zvierat generácií P a F_1 (po odstavení), najvhodnejšie pri príležitosti váženia zvieraťa, čím sa minimalizuje stres z manipulácie. Pozorovania sa starostlivo vykonávajú a zaznamenávajú s použitím systémov hodnotenia, ktoré definuje testovacie laboratórium. Je potrebné minimalizovať odlišnosti v podmienkach testovania. Medzi príznaky, ktoré je potrebné si všímať, patria zmeny na koži, kožušine, očiach, sliznici, výskyt sekrécie, exkrécie a vegetatívnej aktivity (napríklad slzenie, piloerekcia, veľkosť zreničiek, nezvyčajné dýchanie), ale uvedený výpočet príznakov nie je vyčerpávajúci. Zmeny chôdze, postoja a reakcie na manipuláciu, ako aj prítomnosť šklbavých pohybov alebo svalové napätie, stereotypné (napríklad nadmerné očisťovanie tela, opakované krúženie) alebo výstredné správanie (napríklad samomrzačenie, cúvanie) je nutné tiež zaznamenať.

▼M5

Telesná hmotnosť a spotreba potravy/vody

38. Zvieratá generácie P sa vážia v prvý deň podávania dávky a potom najmenej raz týždenne. Samice generácie P sa okrem toho počas laktácie vážia v tých istých dňoch, keď sa vážia mláďatá z ich vrhov (pozri odsek 44). Všetky zvieratá generácie F_1 sa vážia individuálne po odstavení (21. PND) a potom najmenej raz týždenne. Telesná hmotnosť sa zaznamenáva aj v deň, keď dosiahnu pohlavnú zrelosť (ukončenie oddeľovania predkožky alebo otvárania vagíny). Všetky zvieratá sa vážia pri usmrtení.

39. Počas štúdie sa zaznamenáva spotreba potravy a vody (v prípade podávania testovanej chemikálie v pitnej vode) najmenej raz týždenne v rovnaké dni ako telesná hmotnosť zvierat (s výnimkou obdobia párenia). Spotreba potravy v každej klietke so zvieratami generácie F_1 sa zaznamenáva raz týždenne od ich zaradenia do príslušnej kohorty.

Estrálne cykly

40. Predbežné informácie o účinkoch na estrálny cyklus súvisiacich s testovanou chemikáliou môžu byť dostupné už z predchádzajúcich štúdií toxicity s opakovanými dávkami a môžu sa použiť pri vypracovávaní protokolu pre rozšírenú jednogeneračnú štúdiu reprodukčnej toxicity konkrétnej testovanej chemikálie. Posudzovanie estrálneho cyklu (pomocou vaginálnej cytológie) sa spravidla začne na začiatku obdobia testovania a pokračuje až do potvrdenia párenia alebo do konca dvojtýždňového obdobia párenia. Ak sa u samíc vykonával skríning zameraný na normálny estrálny cyklus už pred testovaním, je užitočné pokračovať so stermi aj po začiatku testovania, ale ak existujú obavy z nešpecifických účinkov po začiatku testovania (ako napríklad počiatočné výrazné zníženie spotreby potravy), dá sa zvieratám umožniť, aby sa prispôsobili testovaniu po dobu až dvoch týždňov pred začiatkom dvojtýždňového obdobia odoberania sterov, ktoré ďalej vedie k páreniu. Ak sa takýmto spôsobom predĺži obdobie testovania samíc (t. j. na štvortýždňové testovanie pred párením), je potrebné zvážiť získanie mladších zvierat a predĺženie aj obdobia testovania samcov pred párením. Pri odbere vaginálnych/cervikálnych buniek je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa neporušila sliznica a následne nevyvolala pseudogravidita (10) (11).

41. Vaginálne stery sa vyšetrujú denne u všetkých samíc generácie F_1 v kohorte 1A od začiatku otvárania vagíny, až kým sa nezaznamená prvý zrohovatený ster, s cieľom určiť časový interval medzi týmito dvomi udalosťami. Estrálny cyklus všetkých samíc generácie F_1 v kohorte 1A sa tiež monitoruje počas obdobia dvoch týždňov so začiatkom okolo 75. PND. Ak je navyše potrebné párenie generácie F_1, v kohorte 1B sa sleduje vaginálna cytológia od doby začiatku párenia po zaznamenanie dôkazu o párení.

Párenie a gravidita

42. Okrem štandardných sledovaných parametrov (napríklad telesná hmotnosť, spotreba potravy, klinické pozorovania vrátane kontroly mortality/morbidity) sa zaznamenávajú aj dátumy párenia, dátum inseminácie a dátum pôrodu a vypočítava sa predkoitálny interval (od začiatku párenia po inseminániu) a dĺžka trvania gravidity (od inseminácie po pôrod). Samice generácie P sa musia v čase očakávaného pôrodu starostlivo vyšetriť na akékoľvek príznaky dystokie. Zaznamenať treba akékoľvek abnormality v správaní pri hniezdení alebo počas laktácie.

▼M5

43. Deň, keď dôjde k pôrodu, je 0. deň laktácie pre samicu a 0. postnatálny deň (0. PND) pre potomstvo. Alternatívne môžu byť všetky porovnania tiež založené na postkoitálnom čase, aby sa eliminovali chybné údaje o postnatálnom vývoji v dôsledku rozdielov v dĺžke trvania gravidity. Zaznamenať však treba aj časové údaje vo vzťahu k pôrodu. To je obzvlášť dôležité, keď testovaná chemikália ovplyvňuje dĺžku trvania gravidity.

Parametre potomstva

44. Každý vrh je potrebné vyšetriť čo najskôr po pôrode (0. alebo 1. PND), aby sa zistil počet a pohlavie mláďat, mŕtvo narodených a živo narodených jedincov a výskyt nápadných anomálií (navonok viditeľné abnormality vrátane rázštepu podnebia, podkožné hemorágie, abnormálna farba alebo textúra kože, prítomnosť pupočnej šnúry, nedostatok mlieka v žalúdku, prítomnosť vyschnutých sekrétov). Prvé klinické vyšetrenie novorodencov zahŕňa kvalitatívne posúdenie telesnej teploty, stavu aktivity a reakcií na manipuláciu. Mláďatá, ktoré sa našli mŕtve v 0. PND alebo neskôr, je potrebné vyšetriť na možné defekty a príčinu uhynutia. Živé mláďatá sa spočítajú a každé sa jednotlivo odváži v 0. alebo 1. PND a potom pravidelne, napríklad vo 4., 7., 14. a 21. PND. Klinické vyšetrenia zodpovedajúce veku zvierat sa opakujú pri vážení potomstva, alebo v prípade osobitných zistení pri pôrode aj častejšie. Medzi príznaky, ktoré je potrebné si všímať, patria vonkajšie abnormality, zmeny na koži, kožušine, očiach, sliznici, výskyt sekrécie, exkrécie a vegetatívnej aktivity, ale uvedený výpočet príznakov nie je vyčerpávajúci. Zmeny chôdze, postoja a reakcie na manipuláciu, ako aj prítomnosť šklbavých pohybov alebo svalové napätie, stereotypné alebo výstredné správanie je nutné tiež zaznamenať.

45. Anogenitálna vzdialenosť každého mláďaťa sa odmeria najmenej raz medzi 0. a 4. PND. V deň merania anogenitálnej vzdialenosti sa zisťuje aj telesná hmotnosť mláďaťa a anogenitálna vzdialenosť sa normalizuje na mieru veľkosti mláďaťa, najlepšie na tretiu odmocninu telesnej hmotnosti (12). Prítomnosť prsných bradaviek/dvorcov prsných bradaviek u samčích mláďat sa kontroluje v 12 alebo 13. PND.

46. U všetkých vybraných zvierat generácie F_1, sa denne hodnotí oddelenie žaluďa a predkožky u samcov a otvorenie vagíny u samíc, a to so začiatkom pred očakávaným dňom dosiahnutia týchto sledovaných parametrov, aby sa zistilo, či k pohlavnej zrelosti dôjde skoro. Všímať si treba akékoľvek abnormality pohlavných orgánov, ako je trvalé nedostatočné otvorenie vagíny, hypospádia alebo rázštep penisu. Pohlavná zrelosť zvierat generácie F_1 sa porovnáva s fyzickým vývojom určením veku a telesnej hmotnosti v čase oddelenia žaluďa a predkožky u samcov a otvorenia vagíny u samíc (13).

Posúdenie potenciálnej vývojovej neurotoxicity (kohorty 2A a 2B)

47. Na posúdenie neurotoxicity sa použije 10 samcov a 10 samíc z kohorty 2A a 10 samcov a 10 samíc z kohorty 2B, z každej testovanej skupiny (pre každú kohortu: 1 samec alebo 1 samica na vrh; každý vrh je zastúpený najmenej jedným mláďaťom; náhodný výber). Zvieratá z kohorty 2A sa podrobia posúdeniu sluchovej citlivosti, funkčnej pozorovacej batérii, posúdeniu motorickej aktivity (pozri odseky 48 – 50), a neuropatologickému posúdeniu (pozri odseky 74 – 75). Je potrebné vynaložiť úsilie, aby sa zabezpečilo, že zmeny všetkých testovacích podmienok budú minimálne

▼M5

a nie systematicky súvisiace s ošetrením. K premenným, ktoré môžu ovplyvňovať správanie, patrí hladina zvuku (napríklad krátkodobý hluk), teplota, vlhkosť, osvetlenie, zápach, denná doba a narušenie životného prostredia. Výsledky testov na neurotoxicitu sa interpretujú vo vzťahu k príslušným historickým kontrolným referenčným rozsahom. Zvieratá kohorty 2B sa použijú na neuropatologické posúdenie v 21. alebo 22. PND (pozri odseky 74 – 75).

48. Test sluchovej citlivosti sa vykoná v 24. (± 1) PND s použitím zvierat z kohorty 2A. Deň testovania je potrebné stanoviť vyvážene pre všetky testované a kontrolné skupiny. Každá séria pozostáva z 50 pokusov. Pri vykonávaní testu sluchovej citlivosti sa určí stredná amplitúda odozvy v každom bloku po 10 pokusov (5 blokov po 10 pokusov), pričom podmienky testu sa optimalizujú tak, aby sa v rámci série vytvoril návyk. Tieto postupy musia byť v súlade s testovacou metódou B.53 (35).

49. Vo vhodnom čase medzi 63. a 75. PND sa zvieratá z kohorty 2A podrobia funkčnej pozorovacej batérii a automatickému testu motorickej aktivity. Tieto postupy musia byť v súlade s testovacími metódami B.43 (33) a B.53 (35). Funkčná pozorovacia batéria zahŕňa podrobný opis vzhľadu, správania a funkčnej integrity subjektu. Tieto prvky sa posudzujú prostredníctvom pozorovaní v domácej klietke, po presunutí do zvyčajnej vyšetrovacej miestnosti na pozorovanie (otvorené pole), kde sa zviera voľne pohybuje, a prostredníctvom manipulačného testu. Testovanie pokračuje od najmenej interaktívneho po najviac interaktívne. Zoznam opatrení je uvedený v dodatku 1. Starostlivé pozorovanie všetkých zvierat vykonávajú vyškolení pracovníci, ktorí nie sú oboznámení so stavom testovania zvierat, pričom používajú normované postupy s cieľom minimalizovať variabilitu pozorovateľov. Ak je to možné, odporúča sa, aby ten istý pozorovateľ hodnotil zvieratá v danom teste. Ak to nie je možné, vyžaduje sa určité preukázanie spoľahlivosti medzi pozorovateľmi. Pre každý parameter v batérii testov na správanie sa musia použiť presne prevádzkovo definované stupnice a kritériá hodnotenia. Ak je to možné, vypracujú sa objektívne kvantitatívne miery pre pozorované parametre, ktoré zahŕňajú aj subjektívne hodnotenie. V prípade motorickej aktivity sa každé zviera testuje individuálne. Séria testov má byť dostatočne dlhá, aby sa v rámci série ukázal návyk na kontrolu. Motorická aktivita sa monitoruje automatickým zariadením na záznam aktivity, ktoré musí byť schopné zistiť nárast aj pokles aktivity (t. j. základná aktivita, ktorú meria zariadenie, nesmie byť nastavená tak nízko, aby nebolo možné sledovať pokles, ani tak vysoko, aby nebolo možné sledovať nárast aktivity). Každé zariadenie sa testuje štandardnými postupmi, aby sa v najväčšej možnej miere zabezpečila spoľahlivosť prevádzky všetkých zariadení po celý čas. Pokiaľ je to možné, testované skupiny majú byť vyvážené pre všetky zariadenia. Testované skupiny by mali byť vyvážené po celý čas, aby sa predišlo zmätkom v dôsledku denného rytmu aktivity.

50. Ak sa existujúcimi informáciami preukáže potreba ďalšieho funkčného testovania (napríklad senzorického, sociálneho, kognitívneho), toto testovanie sa musí integrovať tak, aby nebola narušená integrita ostatných hodnotení vykonávaných v rámci štúdie. Ak sa toto testovanie vykonáva na tých istých zvieratách, ktoré sa používajú na štandardný test sluchovej citlivosti, funkčnú pozorovaciu batériu a test motorickej aktivity, iné testy musia byť naplánované tak, aby sa minimalizovalo riziko narušenia integrity pôvodných testov. Doplňujúce postupy môžu byť zvlášť užitočné, keď empirické pozorovanie, očakávané účinky alebo mechanizmus/spôsob pôsobenia poukazuje na konkrétny druh neurotoxicity.

▼M5

Posúdenie potenciálnej vývojovej imunotoxicity (kohorta 3)

51. Na 56. (± 3) PND sa použije 10 samcov a 10 samíc z kohorty 3, z každej testovanej skupiny (1 samec alebo 1 samica na vrh; každý vrh je zastúpený najmenej jedným mláďaťom; náhodný výber), v teste protilátkovej reakcie závislej od T-buniek, t. j. primárnej reakcie protilátky IgM na antigén závislý od T-buniek, ako je napríklad ovčí erytrocyt SRBC (Sheep Red Blood Cell) alebo ustricový hemocyanín KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin), v súlade so súčasnými postupmi testovania immunotoxicity (14), (15). Reakcia sa môže hodnotiť počítaním osobitných buniek tvoriacich plaky (plaque-forming cells – PFC) v slezine, alebo stanovením titra protilátky IgM, špecificky pre SRBC alebo KLH, v sére pomocou imuno-enzymatickej metódy ELISA, pri maximálnej reakcii. Reakcie dosahujú maximum spravidla štyri (reakcia PFC) alebo päť (metóda ELISA) dní po intravenóznej imunizácii. Ak sa primárna protilátková reakcia testuje počítaním plakotvorných buniek, je prípustné hodnotiť podskupiny zvierat v rôzne dni za predpokladu, že: imunizácia a usmrtenie skupiny sa načasuje tak, že plakotvorné bunky sa počítajú pri maximálnej reakcii; že podskupina pozostáva z rovnakého počtu samcov a samíc potomstva zo všetkých dávkových skupín vrátane kontrolných, a že podskupiny sa hodnotia v približne rovnakom postnatálnom veku. Expozícia účinkom testovanej chemikálie bude pokračovať do dňa pred odberom slezín pre hodnotenie reakcie PFC alebo séra pre test ELISA.

Následné posúdenie potenciálnej reprodukčnej toxicity (kohorta 1B)

52. Zvieratá z kohorty 1B sa môžu uchovávať na testovanie dlhšie ako do 90. PND a chovať, aby sa v prípade potreby získala generácia F_2. Samce a samice z tej istej dávkovej skupiny sa pária (zabráni sa páreniu medzi súrodencami) po dobu až dvoch týždňov so začiatkom v 90. PND alebo neskôr, ale nie dlhšie ako do 120. PND. Postupy sú podobné ako v prípade zvierat generácie P. Na základe závažných dôkazov však môže postačovať ukončenie vrhu vo 4. PND, namiesto jeho sledovania do odstavenia alebo ešte dlhšie.

POZOROVANIA PO USMRTENÍ

Klinická biochémia/hematológia

53. Systémové účinky sa monitorujú u zvierat generácie P. Vzorky krvi zo stanovených miest sa rýchlo odoberú u desiatich náhodne vybraných samcov a samíc generácie P z každej dávkovej skupiny po usmrtení, uskladnia sa vo vhodných podmienkach a podrobia sa čiastočným alebo úplným hematologickým vyšetreniam, vyšetreniam klinickej biochémie, testom na T4 a TSH alebo iným vyšetreniam, ktoré vyplývajú zo známeho profilu účinkov testovanej chemikálie (pozri usmerňovací dokument OECD 151 (40)). Vyšetrujú sa tieto hematologické parametre: hematokrit, koncentrácia hemoglobínu, počet erytrocytov, celkový a diferenčný počet leukocytov, počet krvných doštičiek a čas/potenciál zrážanlivosti krvi. Vyšetrenia plazmy alebo séra zahŕňajú: glukózu, celkový cholesterol, močovinu, kreatinín, celkové proteíny, albumín a najmenej dva enzýmy indukujúce hepatocelulárne účinky (ako alanín-aminotransferáza, aspartát-aminotransferáza, alkalická fosfatáza, gamaglutamyl-transpeptidáza a sorbitol-dehydrogenáza). Meranie ďalších enzýmov a žlčových kyselín môže za určitých okolností poskytnúť užitočné informácie. Okrem toho sa krv od

▼M5

všetkých zvierat môže odobrať a uložiť na možné analýzy v neskoršom období, ktoré by pomohli vyjasniť nejednoznačné účinky alebo vytvorili údaje o vnútornej expozícii. Ak sa neuvažuje o druhom párení zvierat generácie P, vzorky krvi sa získajú pred postupom plánovaného usmrtenia, alebo ako súčasť tohto postupu. V prípade, že sa zvieratá zachovajú, vzorky krvi sa odoberú niekoľko dní pred ich druhým párením. Pokiaľ existujúce údaje zo štúdií s opakovanými dávkami nenaznačujú, že testovaná chemikália nemá účinok na daný parameter, pred usmrtením sa vykoná vyšetrenie moču a hodnotia sa tieto parametre: vzhľad, objem, osmolalita alebo špecifická hmotnosť, pH, proteíny, glukóza, krv a krvné bunky, bunkový odpad. Moč sa môže odobrať s cieľom monitorovať exkréciu testovanej chemikálie a/alebo metabolitu (metabolitov).

54. Systémové účinky sa monitorujú u zvierat generácie F_1. Vzorky krvi zo stanovených miest sa rýchlo odoberú u desiatich náhodne vybraných samcov a samíc z kohorty 1A, z každej dávkovej skupiny po usmrtení, uskladnia sa vo vhodných podmienkach a podrobia sa štandardným vyšetreniam klinickej biochémie vrátane posúdenia hladín séra pre tyroidné hormóny (T4 a TSH), hematologickým vyšetreniam (celkový a diferenčný počet leukocytov a erytrocytov) a vyšetreniam moču.

55. Nadbytočné mláďatá sa vo 4. PND podrobia makroskopickej pitve a pozornosť sa venuje meraniu koncentrácií séra pre tyroidný hormón (T4). V prípade potreby sa neonatálna krv (zo 4. PND) môže združovať podľa vrhu na biochemické analýzy/analýzy tyroidného hormónu. Krv sa odoberá aj na analýzy hormónov T4 a TSH od odstavených mláďat, ktoré sa podrobia makroskopickej pitve v 22. PND (mláďatá generácie F_1, ktoré neboli vybrané do kohort).

Parametre spermií

56. Parametre spermií sa merajú u všetkých samcov generácie P, pokiaľ existujúce údaje neukazujú, že počas 90-dňovej štúdie nebol zaznamenaný účinok na parametre spermií. Vyšetrenia parametrov spermií sa vykonajú u všetkých samcov kohorty 1As.

57. Pre všetky samce generácie P a F_1 (kohorta 1A) sa po usmrtení zaznamená hmotnosť semenníkov a nadsemenníkov. Najmenej jeden semenník a jeden nadsemenník sa odložia na histopatologické vyšetrenie. Zostávajúce nadsemenníky sa použijú na vyčíslenie zásob spermií z chvostovej časti nadsemenníkov (16), (17). Spermie z chvostovej časti nadsemenníkov (alebo semenovodov) sa okrem toho odoberú pomocou metód, ktoré minimalizujú poškodenie, na vyšetrenie pohyblivosti a morfológie spermií (18).

58. Pohyblivosť spermií sa môže hodnotiť buď okamžite po usmrtení, alebo zaznamenať pre neskoršiu analýzu. Podiel progresívne pohyblivých spermií sa dá určiť subjektívne alebo objektívne analýzou pohybu pomocou počítača (19), (20), (21), (22), (23), (24). Pri hodnotení morfológie spermií sa vzorka spermií z chvostovej časti nadsemenníkov (alebo semenovodu) vyšetrí ako fixné alebo mokré preparáty (25) a minimálne 200 spermií na vzorku sa zatriedi ako buď normálne (hlavička aj stredná časť/bičík majú normálny vzhľad), alebo abnormálne. Príklady morfologických abnormalít spermií zahŕňajú fúziu, oddelené hlavičky a zdeformované hlavičky a/alebo bičíky (26). Zdeformované alebo veľké hlavičky spermií môžu poukazovať na poruchy v tvorbe spermií.

59. Ak sú vzorky spermií zmrazené, stery odobraté a obrázky z analýzy mobility spermií zaznamenané v čase pitvy (27), následná analýza sa môže obmedziť na kontrolnú skupinu a skupinu samcov s vysokou dávkou. Ak sa však pozorujú účinky v súvislosti s testovaním, hodnotia sa aj skupiny s nižšími dávkami.

▼M5

Makroskopická pitva

60. V čase usmrtenia alebo predčasného úhynu sa u všetkých zvierat generácie P a F_1 vykoná pitva a vyšetrenie na akékoľvek štrukturálne abnormality alebo patologické zmeny. Osobitná pozornosť sa venuje orgánom reprodukčného systému. Moribundné mláďatá, ktoré sa humánnym spôsobom usmrtia, ako aj uhynuté mláďatá sa zaznamenajú, a ak nie sú macerované, vyšetria sa na možné defekty a/alebo príčinu uhynutia a zakonzervujú sa.

61. U dospelých samíc generácií P a F_1 sa v deň pitvy vyšetrí vaginálny ster, aby sa určilo štádium estrálneho cyklu a umožnilo určenie korelácie s histopatológiou v reprodukčných orgánoch. Maternice všetkých samíc generácie P (a v prípade potreby aj samíc generácie F_1) sa vyšetria na prítomnosť a počet implantačných miest spôsobom, ktorý neohrozí histopatologické hodnotenie.

Hmotnosť orgánov a uchovanie tkanív – dospelé zvieratá generácie P a F_1

62. V čase usmrtenia sa určí telesná hmotnosť a mokrá hmotnosť nižšie uvedených orgánov všetkých zvierat generácie P a všetkých dospelých zvierat generácie F_1 z príslušných kohort (ako je uvedené ďalej), a to čo najskôr, aby sa predišlo vysychaniu. Tieto orgány sa potom uchovajú vo vhodných podmienkach. Pokiaľ nie je uvedené inak, párové orgány sa môžu vážiť jednotlivo alebo kombinovane, v súlade s bežnou praxou testovacieho laboratória.

— Maternica (s vajcovodmi a krčkom maternice), vaječníky.

— Semenníky, nadsemenníky (celé a chvostová časť na vzorky, ktoré sa použijú pri počítaní spermií).

— Prostata (kombinácia dorzolaterálnych a ventrálnych častí). Pri odrezávaní komplexu prostaty je potrebná opatrnosť, aby sa zabránilo perforácii semenných vačkov naplnených tekutinou. V prípade účinku súvisiaceho s testom na celkovú hmotnosť prostaty je potrebné po fixácii starostlivo oddeliť dorzolaterálne a ventrálne časti a vážiť ich osobitne.

— Semenné vačky s koagulačnými žľazami a ich tekutinami (ako jedna jednotka).

— Mozog, pečeň, obličky, srdce, slezina, týmus, hypofýza, štítna žľaza (po fixácii), nadobličky a známe cieľové orgány a tkanivá.

63. Okrem uvedených orgánov sa vo vhodných podmienkach uchovajú vzorky periférnych nervov, svalov, miechy, oka s očným nervom, gastrointestinálneho traktu, močového mechúra, pľúc, priedušnice (s pripojenou štítnou žľazou a prištítnou žľazou), kostnej drene, semenovodov (samce), mliečnych žliaz (samce a samice) a vagíny.

64. Všetky orgány zvierat z kohorty 1A sa odvážia a uchovajú pre histopatológiu.

65. Pri vyšetrovaní prenatálne a postnatálne vyvolaných imunotoxických účinkov sa 10 samcov a 10 samíc z kohorty 1A, z každej testovanej skupiny (1 samec alebo 1 samica na vrh; každý vrh je zastúpený najmenej jedným mláďaťom; náhodný výber) sa po usmrtení podrobí týmto úkonom:

— váženie lymfatických uzlín, spojených s cestou expozície aj vzdialených od tejto cesty (na doplnenie hmotnosti nadobličiek, týmusu a sleziny, ktorá už bola zisťovaná u všetkých zvierat kohorty 1A)

▼M5

— analýza subpopulácie slezinových lymfocytov (CD4+ a CD8+ T-lymfocyty, B-lymfocyty a „prirodzení zabíjači“) s použitím polovice sleziny, pričom druhá polovica sleziny sa uchová na histopatologické hodnotenie.

Analýzou subpopulácií slezinových lymfocytov z neimunizovaných zvierat (kohorta 1A) sa určí, či expozícia súvisí s posunom stabilnej imunologickej distribúcie lymfocytov vznikajúcich v týmuse – „pomocníka“ (CD4+) alebo cytotoxického lymfocytu (CD8+), prípadne „prirodzených zabíjačov“ (natural killer – NK) (rýchle reakcie na neoplastické bunky a patogény).

66. U zvierat z kohorty 1B sa tieto orgány odvážia a zodpovedajúce tkanivá sa spracujú do blokovej fázy:

— vagína (neváži sa)

— maternica s krčkom maternice

— vaječníky

— semenníky (najmenej jeden)

— nadsemenníky

— semenné vačky a koagulačné žľazy

— prostata

— hypofýza

— známe cieľové orgány

Histopatologické vyšetrenia sa v kohorte 1B vykonajú, ak výsledky z kohorty 1A sú nejednoznačné, alebo v prípadoch podozrivých reprodukčne alebo endokrinne toxických látok.

67. Kohorty 2A a 2B: testovanie vývojovej neurotoxicity (21. alebo 22. PND a dospelé potomstvo). Zvieratá z kohorty 2A sa usmrtia po testovaní správania, pričom sa zaznamená hmotnosť ich mozgu a vykonajú sa úplné neurohistopatologické vyšetrenia na účely posúdenia neurotoxicity. Zvieratá z kohorty 2B sa usmrtia v 21. alebo 22. PND, pričom sa zaznamená hmotnosť ich mozgu a vykoná sa mikroskopické preskúmanie mozgu na účely posúdenia neurotoxicity. U zvierat z kohorty 2A a voliteľne z kohorty 2B sa vyžaduje fixovanie premývaním, ako je uvedené v testovacej metóde B.53 (35).

Hmotnosť orgánov a uchovanie tkanív – odstavené mláďatá generácie F_1

68. Mláďatá, ktoré neboli vybrané do kohort, vrátane nevyvinutých jedincov, sa usmrtia po odstavení, v 22. PND, pokiaľ výsledky nepoukazujú na potrebu ďalších analýz počas života. Usmrtené mláďatá sa podrobia makroskopickej pitve vrátane posúdenia reprodukčných orgánov, ako je opísané v odsekoch 62 a 63. U desiatich mláďat na skupinu, z oboch pohlaví a z čo najväčšieho počtu vrhov, sa odváži a vo vhodných podmienkach uchová mozog, slezina a týmus. Okrem toho sa môžu uchovať prsné tkanivá týchto samčích a samičích mláďat na ďalšiu mikroskopickú analýzu ([1]) (pozri usmerňovací dokument OECD 151 (40)). Výrazné abnormality a cieľové tkanivá sa uchovajú na prípadné histologické vyšetrenie.

([1]) Výskum ukázal, že mliečne žľazy, predovšetkým v raných štádiách vývoja, sú citlivými sledovanými parametrami pre činnosť estrogénov. Odporúča sa, aby sledované parametre týkajúce sa mliečnych žliaz mláďat oboch pohlaví boli po validácii zahrnuté do tejto testovacej metódy.

▼M5

Histopatológia – zvieratá generácie P

69. Úplné histopatologické vyšetrenie orgánov uvedených v odsekoch 62 a 63 sa vykoná u všetkých zvierat generácie P s vysokou dávkou a z kontrolnej skupiny. Orgány, ktoré vykazujú zmeny súvisiace s testovaním, sa vyšetria aj u všetkých zvierat v skupinách s nižšou dávkou, čo pomôže pri určovaní hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL). Ďalej sa podrobia histopatologickému vyšetreniu reprodukčné orgány všetkých zvierat s podozrením na zníženú fertilitu, napríklad tých, ktoré zlyhali pri párení, počatí, plodení alebo vrhnutí zdravého potomstva, alebo u ktorých bol ovplyvnený estrálny cyklus prípadne počet, pohyblivosť alebo morfológia spermií.

Histopatológia – zvieratá generácie F_1

Zvieratá z kohorty 1

70. Úplné histopatologické vyšetrenie orgánov uvedených v odsekoch 62 a 63 sa vykoná u všetkých dospelých zvierat z kohorty 1A s vysokou dávkou a z kontrolnej skupiny. Každý vrh by mal byť zastúpený najmenej jedným mláďaťom oboch pohlaví. Orgány a tkanivá, ktoré vykazujú zmeny súvisiace s testovaním, a všetky výrazné lézie sa vyšetria aj u všetkých zvierat v skupinách s nižšou dávkou, čo pomôže pri určovaní hodnoty NOAEL. Na vyhodnotenie účinkov na lymfoidné orgány vyvolaných v prenatálnom a postnatálnom období sa vykoná aj histopatologické vyšetrenie odobratých lymfatických uzlín a kostnej drene od 10 samcov a 10 samíc z kohorty 1A, čím sa doplnia histopatologické vyšetrenia týmusu, sleziny a nadobličiek, ktoré už boli vykonané u všetkých zvierat kohorty 1A.

71. Reprodukčné a endokrinné tkanivá od všetkých zvierat z kohorty 1B, spracované do blokovej fázy, ako je opísané v odseku 66, sa podrobia histopatologickému vyšetreniu v prípadoch podozrivých reprodukčných alebo endokrinných toxických látok. Histologickému vyšetreniu sa podrobia aj zvieratá z kohorty 1B, ak výsledky z kohorty 1A nebudú jednoznačné.

72. Vaječníky dospelých samíc majú obsahovať primordiálne a rastúce folikuly, ako aj veľké žlté teliesko. Histopatologické vyšetrenie sa preto zameria na kvantitatívne hodnotenie primordiálnych a malých rastúcich folikulov, ako aj veľkého žltého telieska, v telách samíc generácie F_1, pričom počet zvierat, výber rezu vaječníkov a výber veľkosti vzoriek má byť štatisticky primeraný na posúdenie použitej metódy. Stanovenie počtu folikulov sa môže najskôr vykonať u zvierat z kontrolnej skupiny a s vysokou dávkou a v prípade negatívneho účinku na zvieratá s vysokou dávkou sa vyšetrenie vykoná pri nižších dávkach. Do vyšetrenia sa zahrnie stanovenie počtu primordiálnych folikulov, ktoré sa môžu kombinovať s malými rastúcimi folikulmi na porovnanie vaječníkov testovaných a kontrolných samíc (pozri usmerňovací dokument OECD 151 (40)). Posudzovanie veľkého žltého telieska sa vykonáva súbežne s testovaním estrálneho cyklu, preto sa pri posudzovaní môže zohľadniť fáza cyklu. Vajcovod, maternica a vagína sa vyšetrujú na primeranosť vývoja zodpovedajúcu danému orgánu.

73. U samcov generácie F_1 sa vykonajú podrobné testikulárne histopatologické vyšetrenia s cieľom zistiť účinky, súvisiace s testovaním, na diferenciáciu a vývoj semenníkov a na spermatogenézu (38). Ak je to možné, treba vyšetriť rezy rete testis. Hlava, telo a chvostová časť nadsemenníkov a semenovody sa vyšetrujú na primeranosť vývoja zodpovedajúcu danému orgánu a zisťujú sa aj parametre požadované u samcov generácie P.

▼M5

Zvieratá z kohorty 2

74. Neurohistopatologické vyšetrenie sa vykoná u všetkých zvierat oboch pohlaví z kohorty 2A s vysokou dávkou a z kontrolnej skupiny po ukončení neurobehaviorálnych testov (po 75. PND, ale nie neskôr ako v 90. PND). Histopatologické vyšetrenie mozgu sa vykoná u všetkých zvierat oboch pohlaví z kohorty 2B s vysokou dávkou a z kontrolnej skupiny v 21. alebo 22. PND. Orgány alebo tkanivá, ktoré vykazujú zmeny súvisiace s testovaním, sa vyšetria aj u všetkých zvierat v skupinách s nižšou dávkou, čo pomôže pri určovaní hodnoty NOAEL. U zvierat z kohorty 2A a 2B sa skúmajú viaceré rezy mozgu, čo umožní vyšetriť čuchovú guľu, mozgovú kôru, hipokampus, bazálne gangliá, talamus, hypotalamus, stredný mozog (schránka, pokrývka, mozgové stopky), mozgový kmeň a mozoček. Iba v prípade kohorty 2A sa vyšetrujú oči (sietnica a zrakový nerv) a vzorky periférnych nervov, svalov a miechy. Všetky neurohistologické postupy musia byť v súlade s testovacou metódou B.53 (35).

75. Reprezentatívne oblasti mozgu (homologické rezy starostlivo vybrané na základe spoľahlivých mikroskopických rozhraní) podliehajú morfometrickým (kvantitatívnym) hodnoteniam, ktoré môžu zahŕňať lineárne a/alebo plošné merania konkrétnych oblastí mozgu. Z každého rozhrania (úrovne) je potrebné odobrať najmenej tri po sebe idúce rezy, aby sa dal vybrať najhomologickejší a najreprezentatívnejší rez z každej konkrétnej oblasti mozgu, ktorá sa má hodnotiť. Neuropatológ urobí posudok, či rezy pripravené na meranie sú homologické s ostatnými v súbore vzoriek a teda vhodné na zahrnutie, keďže podmienky najmä lineárneho merania sa môžu meniť na pomerne krátkej vzdialenosti (28). Nehomologické rezy sa nepoužijú. Hoci cieľom je odobrať vzorky zo všetkých zvierat vyhradených na tento účel (10/pohlavie/úroveň dávky), aj nižšie počty môžu byť primerané. Počet vzoriek od menej než 6 zvierat/pohlavie/úroveň dávky sa však vo všeobecnosti nepovažuje za dostatočný na účely tejto testovacej metódy. Na identifikáciu účinkov súvisiacich s testovaním na parametre, ako je objem alebo počet buniek pre konkrétne neuroanatomické oblasti, sa môže použiť stereológia. Všetky aspekty prípravy vzoriek tkaniva, od fixácie tkaniva, cez vyrezanie vzoriek tkaniva, spracovanie tkaniva až po farbenie sklíčok musia mať vyváženú štruktúru tak, aby všetky súbory obsahovali reprezentatívne vzorky z každej dávkovej skupiny. Ak sa majú použiť morfometrické alebo stereologické analýzy, mozgové tkanivo je potrebné uložiť do vhodného média pre všetky hladiny dávky v tom istom čase, aby sa predišlo zmršteniu štruktúry buniek spojenému s predĺženým uložením vo fixačnom prostriedku.

PREDKLADANIE SPRÁV

Údaje

76. Údaje sa zaznamenávajú jednotlivo a sumarizujú vo forme tabuliek. Pre každú testovanú skupinu a každú generáciu sa v správe uvedú podľa možnosti tieto údaje: počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat, ktoré uhynuli počas testu, alebo boli usmrtené z humánnych dôvodov, čas každého úmrtia alebo humánneho usmrtenia, počet plodných zvierat, počet gravidných samíc, počet samíc, ktoré vrhli mláďatá a počet zvierat vykazujúcich príznaky toxicity. Potrebné je uviesť aj opis toxicity vrátane času nástupu, trvania a závažnosti.

77. Číselné výsledky sa vyhodnotia vhodnou a všeobecne prijateľnou štatistickou metódou. Štatistické metódy sa zvolia ako súčasť plánu štúdie a musia primeranie riešiť otázky nenormálnych dát (napríklad údaje o počte), cenzurovaných dát (napríklad obmedzená doba pozorovania), závislosti (napríklad vplyvy vrhu a opakované merania) a

▼M5

nerovnakého rozptylu. Zovšeobecnené lineárne zmiešané modely a modely dávka – reakcia zahŕňajú širokú škálu analytických nástrojov, ktoré môžu byť vhodné pre údaje získané v rámci tejto metódy. Správa obsahuje dostatok informácií o analytickej metóde a použitom počítačovom programe, aby nezávislý posudzovateľ/štatistik mohol vyhodnotiť a prehodnotiť analýzu.

Vyhodnotenie výsledkov

78. Zistenia sa môžu vyhodnotiť z hľadiska pozorovaných účinkov, a to vrátane zistení z pitvy a mikroskopických zistení. Hodnotenie zahŕňa vzťah medzi dávkou a výskytom, dôsledkami a závažnosťou abnormalít vrátane výrazných lézií, alebo neexistenciu takého vzťahu. Posúdiť treba aj otázky cieľových orgánov, plodnosti, klinických abnormalít, činností reprodukcie a rodenia, zmien telesnej hmotnosti, mortality a ďalších toxických a vývojových účinkov. Osobitnú pozornosť je potrebné venovať zmenám špecifickým pre jednotlivé pohlavia. Pri hodnotení výsledkov testu treba zvážiť fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie a údaje o timidínovej kináze vrátane placentárneho prenosu a exkrécie do mlieka, ak sú tieto údaje k dispozícii.

Správa o teste

79. Správa o teste musí obsahovať tieto informácie získané v danej štúdii o zvieratách generácií P a F_1 a o zvieratách generácie F_2 (v prípade potreby):

Testovaná chemikália:

— všetky dôležité dostupné údaje o chemických, toxikokinetických a toxikodynamických vlastnostiach testovanej chemikálie,

— identifikačné údaje,

— čistota;

Nosič (v prípade potreby):

— zdôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda;

Pokusné zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo, materiál na hniezdenie atď.,

— individuálne hmotnosti zvierat na začiatku testu,

— údaje o vaginálnych steroch u samíc generácie P pre začiatkom testovania (ak sa údaje v tom čase získavali),

— záznamy o párení generácie P, v ktorých sú označení páriaci sa partneri, samec a samica, a tiež úspešný výsledok párenia,

— vrh z pôvodných záznamov o dospelých zvieratách generácie F_1;

Podmienky testu:

— zdôvodnenie výberu hladiny dávok,

— podrobné údaje o zložení testovanej chemikálie/príprave krmiva, dosiahnutých koncentráciách,

▼M5

— stabilita a homogénnosť prípravku v nosiči (napríklad v krmive, pitnej vode), v krvi a/alebo mlieku pri splnení podmienok použitia a uskladnenia v prestávke medzi obdobiami používania,

— podrobné údaje o podávaní testovanej chemikálie,

— prepočet koncentrácie testovanej chemikálie v krmive/pitnej vode (ppm) na dosiahnutú dávku (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), v prípade potreby,

— podrobné údaje o kvalite potravy a vody (vrátane zloženia krmiva, ak sú údaje k dispozícii),

— podrobný opis postupov náhodného výberu mláďat na vyradenie a náhodného zaraďovania mláďat do testovaných skupín,

— podmienky prostredia,

— zoznam pracovníkov realizujúcich štúdiu vrátane odbornej prípravy;

Výsledky (súhrn a individuálne údaje podľa pohlavia a dávky):

— spotreba potravy, spotreba vody (ak sú údaje k dispozícii), účinnosť potravy (prírastok telesnej hmotnosti na gram skonzumovanej potravy, okrem obdobia párenia a laktácie) a spotreba testovanej chemikálie (pri podávaní krmiva/pitnej vody) pre zvieratá generácie P a F_1,

— údaje o absorpcii (ak sú k dispozícii);

— údaje o telesnej hmotnosti zvierat generácie P,

— údaje o telesnej hmotnosti vybraných zvierat generácie F_1 po odstavení,

— čas uhynutia počas štúdie alebo údaj, či zvieratá prežili do usmrtenia,

— charakter, tvrdosť a trvanie klinických pozorovaní (či sú reverzibilné alebo nie),

— údaje z hematologických vyšetrení, vyšetrení moču a klinickej biochémie vrátane údajov o hormónoch TSH a T4,

— fenotypická analýza buniek sleziny (T-, B-, NK-bunky),

— bunečnosť kostnej drene,

— údaje o toxickej reakcii,

— počet samíc generácie P a F_1 s normálnym alebo abnormálnym estrálnym cyklom a trvanie cyklu,

— čas párenia (predkoitálny interval, počet dní medzi spárovaním a párením),

— toxické alebo iné účinky na reprodukciu vrátane počtov a percentuálnych podielov zvierat, ktoré zvládli párenie, graviditu, pôrod a laktáciu, samcov, ktorí vyvolali graviditu, samíc s príznakmi dystokie/dlhého alebo ťažkého pôrodu,

— doba trvania gravidity a pôrodu, ak je údaj k dispozícii,

— počet implantácií, veľkosť vrhu a percentuálny podiel samčích mláďat,

— počet a percentuálny podiel poimplantačných strát, živo narodených a mŕtvo narodených jedincov,

▼M5

— údaje o hmotnosti vrhu a jednotlivých mláďat (samcov, samíc a kombinovane), počet nevyvinutých jedincov, ak bol zistený,

— počet mláďat s výrazne viditeľnými abnormalitami,

— toxické alebo iné účinky na potomstvo, postnatálny rast, životaschopnosť atď.,

— údaje o fyzických medzníkoch vo vývoji mláďat a iné postnatálne údaje o vývoji,

— údaje o pohlavnej zrelosti zvierat generácie F_1,

— údaje o vyšetreniach funkčnosti u mláďat a dospelých jedincov, ak je to možné,

— telesná hmotnosť pri usmrtení a údaje o absolútnych a relatívnych hmotnostiach orgánov zvierat generácie P a dospelých zvierat generácie F_1,

— pitevné nálezy,

— podrobný opis všetkých histopatologických nálezov,

— celkový počet spermií z chvostovej časti nadsemenníkov, percentuálny podiel progresívne sa pohybujúcich spermií, percentuálny podiel morfologicky normálnych spermií a percentuálny podiel spermií s každou identifikovanou abnormalitou u samcov generácií P a F_1,

— počet a štádium zrelosti folikulov obsiahnutých vo vaječníkoch samíc generácií P a F_1, ak je to vhodné,

— vyčíslenie počtu veľkých žltých teliesok (corpora lutea) vo vaječníkoch samíc generácie F_1,

— štatisticky spracované výsledky, ak je to vhodné.

Parametre kohorty 2:

— podrobný opis postupov používaných na normovanie vyšetrení a postupov, ako aj prevádzkové vymedzenia pojmov pre hodnotiace vyšetrenia,

— zoznam všetkých použitých testovacích postupov a odôvodnenie ich použitia,

— podrobné údaje o použitých behaviorálnych/funkčných, neuropatologických a morfometrických postupoch vrátane informácií a podrobných údajov o automatických zariadeniach,

— postupy na kalibráciu a zabezpečenie rovnocennosti zariadení, ako aj vyváženie testovacích skupín v rámci testovacích postupov,

— krátke odôvodnenie, ktorým sa vysvetľuje každé rozhodnutie obsahujúce odborný posudok,

— podrobný opis všetkých behaviorálnych/funkčných, neuropatologických a morfometrických nálezov podľa pohlavia a dávkovej skupiny vrátane nárastu a poklesu v kontrolnej skupine,

— hmotnosť mozgu,

— každá diagnóza stanovená na základe neurologických príznakov a lézií vrátane prirodzene vznikajúcich chorôb alebo podmienok,

— obrázky exemplárnych nálezov,

— obrázky s nízkou energiou na posúdenie homológie častí používaných na morfometriu,

▼M5

— štatistické spracovanie výsledkov vrátane štatistických modelov používaných na analyzovanie údajov a výsledkov bez ohľadu na to, či boli významné alebo nie,

— vzťah iných toxických účinkov k záveru o neurotoxickom potenciáli testovanej chemikálie podľa pohlavia a dávkovej skupiny,

— vplyv akejkoľvek toxikokinetickej informácie na závery,

— údaje podporujúce spoľahlivosť a citlivosť testovacej metódy (t. j. pozitívne a historické kontrolné údaje),

— vzťahy, ak nejaké sú, medzi neuropatologickými a funkčnými účinkami,

— hodnota NOAEL alebo referenčná dávka pre samice a potomstvo, podľa pohlavia a dávkovej skupiny,

— diskusia celkovej interpretácie údajov na základe výsledkov vrátane záveru o tom, či chemikália spôsobila vývojovú neurotoxicitu alebo nie, a na základe hodnoty NOAEL;

Parametre kohorty 3:

— titer séra protilátky IgM (senzibilizácia na SRBC alebo KLH) alebo slezinové jednotky IgM PFC (senzibilizácia na SRBC),

— vykonávanie metódy TDAR musí v rámci procesu optimalizácie potvrdiť laboratórium pri prvej príprave testu a periodicky (napríklad raz ročne) všetky laboratóriá,

— diskusia celkovej interpretácie údajov na základe výsledkov vrátane záveru o tom, či chemikália spôsobila vývojovú imunotoxicitu alebo nie, a na základe hodnoty NOAEL.

Rozbor výsledkov

Závery vrátane hodnôt NOAEL týkajúce sa účinkov na rodičov a potomstvo

Predložiť by sa mali aj všetky informácie nezískané počas štúdie, ale užitočné pre interpretáciu výsledkov (napríklad podobnosť účinkov s akýmikoľvek známymi neurotoxínmi).

Interpretácia výsledkov

80. Rozšírená jednogeneračná štúdia reprodukčnej toxicity poskytne podľa potreby informácie o účinkoch opakovanej expozície chemikálií počas všetkých fáz reprodukčného cyklu. Štúdia predovšetkým poskytne informácie o reprodukčnom systéme a o sledovaných faktoroch vývoja, rastu, prežitia a o funkčných faktoroch potomstva do 90. PND.

81. Interpretácia výsledkov štúdie musí zohľadniť všetky dostupné informácie o chemikálii vrátane fyzikálno-chemických, toxikokinetických a toxikodynamických vlastností, dostupných dôležitých informácií o štrukturálnych analógiách a výsledkov predchádzajúcich štúdií toxicity testovanej chemikálie (napríklad akútnej toxicity, toxicity po opakovanej aplikácii, štúdie mechanizmov a štúdie posudzujúce, či existujú zásadné kvalitatívne a kvantitatívne rozdiely medzi druhmi, pokiaľ ide o metabolické vlastnosti in vivo/in vitro). Výsledky makroskopickej pitvy a hmotnosti orgánov sa posúdia v súvislosti so zisteniami z iných štúdií pri opakovaných dávkach, ak je to možné. Pokles vzrastu potomstva sa môže považovať za prejav vplyvu testovanej chemikálie na zloženie mlieka (29).

▼M5

Kohorta 2 (vývojová neurotoxicita)

82. Neurobehaviorálne a neuropatologické výsledky sa interpretujú v súvislosti so všetkými nálezmi, pričom sa využíva prístup váhy dôkazov a odborné posudky. Schémy behaviorálnych alebo morfologických nálezov, ak existujú, ako aj dôkazy o vzťahu medzi dávkou a reakciou je potrebné podrobiť rozboru. Táto charakterizácia by mala zahŕňať aj hodnotenie vývojovej neurotoxicity vrátane epidemiologických štúdií na ľuďoch alebo správ o prípadoch, a tiež experimentálne štúdie zvierat (napríklad toxikokinetické údaje, informácie o štrukturálnej činnosti, údaje z iných štúdií toxicity). Hodnotenie údajov musí zahŕňať aj rozbor biologickej a štatistickej významnosti. Do hodnotenia sa musí zahrnúť aj vzťah, ak existuje, medzi pozorovanými neuropatologickými zmenami a zmenami správania. Usmernenie k interpretácii výsledkov vývojovej neurotoxicity je obsiahnuté v testovacej metóde B.53 (35) a v publikácii Tyla a kol., 2008 (31).

Kohorta 3 (vývojová imunotoxicita)

83. Potlačenie alebo posilnenie funkcie imunity, posudzované metódou TDAR (T-cell dependant antibody response – protilátková reakcia závislá od T-buniek), sa musí hodnotiť v súvislosti so všetkými vykonanými pozorovaniami. Význam výsledku testu TDAR môžu podporiť iné účinky na ukazovatele súvisiace s imunológiou (napríklad bunečnosť kostnej drene, hmotnosť a histopatologické vyšetrenie lymfatických tkanív, rozloženie podskupiny lymfocytov). Účinky stanovené metódou TDAR môžu mať menší význam v prípade, že iné toxicity boli pozorované pri nižších koncentráciách expozície.

84. Pomoc pri interpretácii výsledkov skúmania reprodukcie a neurotoxicity poskytne usmerňovací dokument OECD 43 (26).

LITERATÚRA

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. s. 319 - 333.

24. Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), ‘The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations’, *Journal of Andrology*, 10, 401 - 415.

25. Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), ‘Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants’, *Reproductive Toxicology*, 6, 491 - 505.

26. OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Paríž.

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, Paríž.

33. Kapitola B.43 tejto prílohy, Štúdia neurotoxicity u hlodavcov

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, Paríž.

35. Kapitola B.53 tejto prílohy, Štúdia vývojovej neurotoxicity

36. Kapitola B.54 tejto prílohy, Uterotrofický biologický test u hlodavcov: Krátkodobý skríningový test na estrogénne vlastnosti

37. Kapitola B.55 tejto prílohy, Hershbergerov biologický test u potkanov: Krátkodobý skríningový test na (anti)androgénne vlastnosti

▼**M5**

38. OECD (2009), Guidance Document for Histologic Evalution of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paríž.

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, Paríž.

40. OECD (2013), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paríž.

▼**M5**

Dodatok č. 1

Kritériá a pozorovania zahrnuté vo funkčnej pozorovacej batérii (kohorta 2a)

Domovská klietka a otvorený priestor	Manipulácia	Fyziológia
Postoj	Jednoduchosť odstránenia	Teplota
Nedobrovoľné šklbavé pohyby a svalové napätie	Jednoduchosť zaobchádzania	Telesná hmotnosť
Palpebrálne zatvorenie	Svalový tonus	Reakcia zreničky
Piloerekcia	Reakcia na priblíženie	Veľkosť zreničky
Slinenie	Reakcia na dotyk	
Slzenie	Sluchová reakcia	
Vydávanie zvukov	Reakcia na stisnutie chvosta	
Odchov	Polohová reakcia	
Odchýlky chôdze	Slabosť dopadajúcich nôh	
Vzrušenie	Sila zovretia prednými končatinami	
Stereotypy	Sila zovretia zadnými končatinami	
Výstredné správanie		
Škvrny		
Respiračné odchýlky		

▼**M5**

Dodatok č. 2

VYMEDZENIA POJMOV

Chemikália: látka alebo zmes

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy

▼M5

B.57. SKÚŠKA STEROIDOGENÉZY H295R

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 456 (2011). OECD spustila v roku 1998 prioritnú aktivitu na revidovanie a vypracovanie nových usmernení na vykonávanie testov na skríning a testovanie možných chemikálií narúšajúcich endokrinný systém. Koncepčný rámec OECD na testovanie a hodnotenie chemikálií narúšajúcich endokrinný systém z roku 2002 pozostáva z piatich úrovní, pričom každá úroveň zodpovedá inej úrovni biologickej náročnosti (1). Skúška in vitro steroidogenézy H295R (H295R) opísaná v tejto testovacej metóde používa ľudskú bunkovú líniu adrenokarcinómu (bunky NCI-H295R) a predstavuje „skúšku in vitro, ktorá poskytuje mechanistické údaje“ na úrovni 2, ktoré sa používajú na účely skríningu a prioritizácie. Toto testovanie sa na vyšetrenie chemických účinkov na steroidogenézu, najmä na produkciu 17β-estradiolu (E2) a testosterónu (T), vypracovalo a štandardizovalo vo viacerých krokoch. Skúška H295R sa optimalizovala a validovala (2) (3) (4) (5).

2. Cieľom skúšky steroidogenézy H295R je určiť chemikálie, ktoré ovplyvňujú produkciu E2 a T. Skúškou H295R sa majú identifikovať xenobiotiká, ktorých cieľovým miestom/cieľovými miestami sú endogénne zložky, ktoré tvoria vnútrobunkovú biochemickú cestu začínajúcu sledom reakcií od cholesterolu po produkciu E2 a/alebo T. Skúškou H295R sa nemajú identifikovať chemikálie, ktoré ovplyvňujú steroidogenézu v dôsledku účinkov na os HPG (hypotalamus-hypofýza-pohlavné žľazy). Cieľom skúšky nie je poskytnúť odpoveď ÁNO/NIE, pokiaľ ide o potenciál chemikálie indukovať alebo obmedziť produkciu T a E2; v niektorých prípadoch však možno získať kvantitatívne výsledky (pozri odseky 53 a 54). Výsledky skúšky sa vyjadrujú ako relatívne zmeny produkcie hormónov v porovnaní s kontrolami s aplikáciou rozpúšťadla. Cieľom skúšky nie je poskytnúť konkrétne mechanistické informácie týkajúce sa interakcie testovanej chemikálie s endokrinným systémom. Vykonal sa výskum s použitím bunkovej línie na identifikáciu účinkov na špecifické enzýmy a prostredné hormóny, ako je napríklad progesterón (2).

3. Vymedzenia pojmov a skratky použité v tejto testovacej metóde sú opísané v dodatku. Podrobný protokol vrátane pokynov na prípravu roztokov, kultiváciu buniek a vykonávanie rôznych aspektov testu sú k dispozícii ako dodatok I až III k dokumentu OECD s názvom Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production (4).

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

4. V biosyntéze pohlavných steroidných hormónov pôsobí päť rôznych enzýmov, ktoré katalyzujú šesť rôznych reakcií. Enzymatická konverzia cholesterolu na pregnenolon enzýmom štiepiacim cholesterolový postranný reťazec (CYP11A) cytochrómu P450 (CYP) predstavuje prvý krok v sérii biochemických reakcií, ktoré kulminujú syntézou steroidných konečných produktov. V závislosti od poradia ďalších dvoch reakcií sa steroidogenetická dráha rozdeľuje na dve dráhy, dráhu Δ^5-hydroxysteroidu a dráhu Δ^4-ketosteroidu, ktoré sa spájajú do produkcie androsténdiónu (obrázok č. 1).

5. Androsténdión sa mení na testosterón (T) dehydrogenáciou 17β-hydroxysteroidu (17β-HSD). Testosterón je tak medziprodukt, ako aj konečný hormonálny produkt. T sa u samcov môže meniť na dihydrotestosterón (DHT) 5α-reduktázou, ktorá sa nachádza v bunkových membránach, obale bunkového jadra a v endoplazmatickom retikule cieľových tkanív androgénnej činnosti, ako sú prostata a semenné mechúriky. DHT je ako androgén podstatne silnejší ako T a považuje sa tiež za konečný hormón. Skúškou H295R sa nemeria DHP (pozri odsek 10).

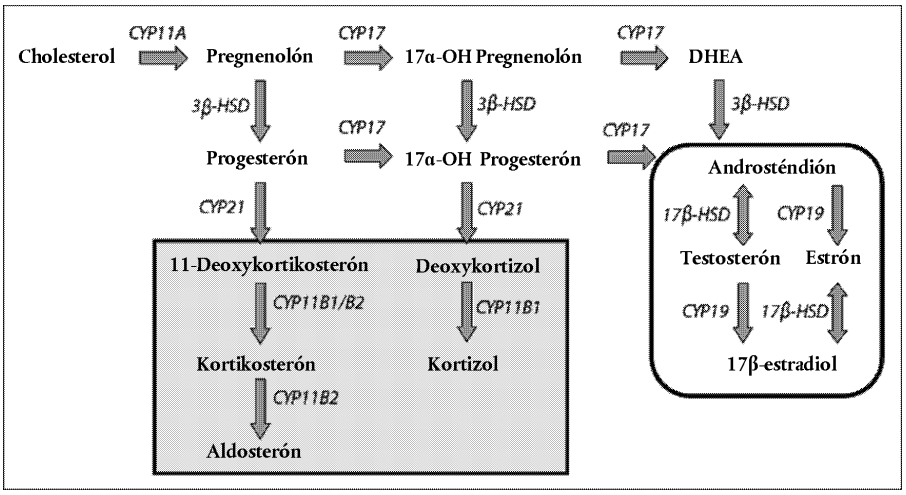
▼M5

6. Enzým v steroidogénnej dráhe, ktorý premieňa androgénne chemikálie na estrogénne chemikálie, je aromatáza (CYP19). CYP19 premieňa T na 17β-estradiol (E2) a androstendión na estrón. E2 a T sa považujú za konečné hormóny steroidogenézy.

7. Špecifickosť činnosti lyázy CYP17 je u jednotlivých druhov pre prostredné substráty rozdielna. U ľudí uprednostňuje tento enzým substráty dráhy Δ^5-hydroxysteroidu (pregnenolon), zatiaľ čo u potkanov sa uprednostňujú substráty v dráhe Δ^4-ketosteroidu (progesterón) (19). Týmito rozdielmi činnosti lyázy CYP17 možno vysvetliť rozdielne reakcie jednotlivých druhov na chemikálie, ktoré menia steroidogenézu in vivo (6). Ukázalo sa, že bunky H295 najlepšie odrážajú model expresie enzýmu ľudskej dospelej nadobličky a produkcie steroidu (20), ale je známe, že exprimujú enzýmy pre dráhu Δ^5-hydroxysteroidu a aj pre dráhu Δ^4-ketosteroidu pre androgénnu syntézu (7) (11) (13) (15).

Obrázok č. 1

Steroidogenéza v bunkách H295R



Poznámka:

Enzýmy sú označené kurzívou, hormóny sú označené tučným písmom a šípky označujú smer syntézy. Šedé pozadie označuje dráhy/produkty kortikosteroidov. Dráhy/produkty pohlavných steroidov sú zakrúžkované. CYP = cytochróm P450; HSD = hydroxysteroid-dehydrogenáza; DHEA = dehydroepiandrosterón.

8. Ľudská bunková línia adrenokarcinómu H295R je užitočný in vitro model skúmania účinkov na syntézu steroidných hormónov (2) (7) (8) (9) (10). Bunková línia H295R exprimuje gény, ktoré kódujú pre všetky kľúčové enzýmy pre steroidogenézu uvedenú skôr v texte (11) (15) (obrázok č. 1). Je to jedinečná vlastnosť, pretože expresia in vivo týchto génov je špecifická pre jednotlivé tkanivá a vývojové stupne, pričom zvyčajne žiadne tkanivo ani žiadny vývojový stupeň neexprimuje všetky gény zúčastňujúce sa na steroidogenéze (2). Bunky H295R majú fyziologické charakteristiky buniek zonálne nediferencovaných ľudských fetálnych nadobličiek (11). Bunky predstavujú jedinečný systém in vitro, keďže majú schopnosť produkovať všetky steroidné hormóny, ktoré sa nachádzajú v kôre dospelej nadobličky a v pohlavných žľazách, čo umožňuje testovanie účinkov na syntézu kortikosteroidov a aj na produkciu pohlavných steroidných hormónov, ako

▼M5

sú androgény a estrogény, hoci skúška je validovaná len na zisťovanie T a E2. Zmeny zaznamenané systémom testovania vo forme zmeny produkcie T a E2 môžu byť výsledkom mnohých rôznych interakcií testovaných chemikálií so steroidogénnymi funkciami, ktoré exprimujú bunky H295R. Medzi ne patrí zmena expresie, syntézy alebo funkcie enzýmov zúčastňujúcich sa na produkcii, premene alebo odstraňovaní steroidných hormónov (12) (13) (14). Inhibícia produkcie hormónov môže byť spôsobená priamou konkurenčnou väzbou na enzým v dráhe, vplyvom na spolufaktory, ako sú NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfát) a cAMP (cyklický adenozínmonofosfát), a/alebo zvýšením steroidného metabolizmu alebo potlačením génovej expresie určitých enzýmov v steroidogenéze. Zatiaľ čo inhibícia môže byť funkciou priamych alebo nepriamych procesov súvisiacich s produkciou hormónov, indukcia je zvyčajne nepriama, napríklad tým, že ovplyvňuje spolufaktory, ako sú NADPH a cAMP (ako v prípade forskolínu), znižuje steroidný metabolizmus (13) alebo zvyšuje steroidogénovú expresiu génov.

9. Skúška H295R má viaceré výhody:

— umožňuje určiť zvýšenie a zníženie produkcie T a E2;

— umožňuje priame posúdenie možného vplyvu chemikálie na životaschopnosť/cytotoxicitu buniek. Je to dôležitý prvok, keďže umožňuje rozlišovať účinky spôsobené cytotoxicitou od účinkov spôsobených priamou interakciou chemikálií so steroidogenézou, čo nie je možné v systémoch tkanivových explantátov, ktoré pozostávajú z rozmanitých typov buniek rôznej citlivosti a rôznych funkčností;

— nevyžaduje si použitie zvierat;

— bunková línia H295R je komerčne dostupná.

10. Zásadné obmedzenia skúšky sú tieto:

— jej metabolická schopnosť je neznáma, pravdepodobne je však pomerne obmedzená; preto sa v tejto skúške pravdepodobne prehliadnu chemikálie, ktoré sa musia metabolicky aktivovať;

— keďže H295R sa získava z tkaniva nadobličiek, obsahuje enzýmy schopné produkovať glukokortikoidy a mineralokortikoidy, ako aj pohlavné hormóny, preto by účinky na produkciu glukokortikoidov a mineralokortikoidov mohli ovplyvniť úrovne T a E2 pozorované v skúške;

— nemeria DHT, a preto zrejme nezistí chemikálie, ktoré potláčajú 5α-reduktázu, v takomto prípade sa môže použiť Hershbergerov test(16);

— skúškou H295R sa nezistia chemikálie, ktoré narúšajú steroidogenézu ovplyvnením HPG osi (hypotalamus-hypofýza-pohlavné žľazy), keďže to možno skúmať len v prípade neporušených zvierat.

PRINCÍP TESTU

11. Cieľom skúšky je zistiť chemikálie, ktoré ovplyvňujú produkciu T a E2. T je tiež medzistupeň v produkcii E2. Skúškou možno zistiť chemikálie, ktoré typicky potláčajú alebo indukujú enzýmy steroidogenézy.

▼M5

12. Skúška sa zvyčajne vykonáva v štandardných podmienkach kultivácie buniek na 24-jamkových platničkách pre bunkové kultúry. Prípadne možno na vykonanie skúšky použiť platničky iných veľkostí; nasadenie a podmienky skúšky by sa však mali vhodne upraviť tak, aby boli dodržané kritériá vykonávania.

13. Po aklimatizačnom období 24 hodín na viacjamkových platničkách sa bunky po dobu 48 hodín vystavia siedmim koncentráciám testovaných chemikálií, a to minimálne trojmo. Rozpúšťadlo, známy inhibítor a spúšťač produkcie hormónov sa testujú v pevnej koncentrácii ako negatívne a pozitívne kontrolné vzorky. Na konci doby expozície sa z každej jamky odstráni médium. Životaschopnosť buniek v každej bunke sa analyzuje hneď po odstránení média. Koncentrácie hormónov v médiu možno merať pomocou rôznych metód, a to aj pomocou komerčne dostupných súprav na meranie hormónov a/alebo inštrumentálnych metód, ako je napríklad metóda kvapalinovej kromatografie – hmotnostnej spektrometrie (LC-MS). Údaje sa vyjadrujú ako násobná zmena v porovnaní s kontrolou rozpúšťadla a najnižšou koncentráciou s pozorovaným účinkom (LOEC). Keď je skúška negatívna, najvyššia testovaná koncentrácia sa uvedie ako koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC). Závery týkajúce sa schopnosti chemikálie ovplyvniť steroidogenézu by mali byť založené najmenej na dvoch nezávislých pokusoch. Prvý pokus môže fungovať ako pokus na zistenie rozsahu, v druhom a prípadne treťom pokuse sa rozsahy následne upravujú, ak sa vyskytnú problémy s rozpustnosťou alebo cytotoxicitou alebo ak sa zdá, že chemikália je na konci rozsahu testovaných koncentrácií.

PRÍPRAVA KULTÚR

Bunková línia

14. Bunky NCI-H295R sú komerčne dostupné z kolekcie kultúr amerického typu (ATCC) po podpísaní dohody o prenose materiálu (MTA) ([1]).

Úvod

15. Z dôvodu zmien schopnosti buniek produkovať E2 s narastajúcim vekom/zvyšujúcimi sa pasážami (2) by sa bunky pred použitím mali kultivovať na základe osobitného protokolu a počtu pasáží, keďže bunky boli rozmrazené, a mal by sa poznamenať aj počet pasáží, pri ktorom boli bunky zamrazené a umiestnené v tekutom dusíku na uskladnenie. Prvým číslom sa označuje aktuálne číslo pasáže bunky a druhým číslom sa opisuje počet pasáži, pri ktorom sa bunky zamrazili a uskladnili. Napríklad bunky, ktoré sa zamrazili po piatej pasáži a rozmrazili, a potom sa trikrát delili (4 pasáže, pričom čerstvo rozmrazené bunky sa počítajú ako pasáž 1), by sa po opätovnej kultivácii označili ako pasáž 4.5. Príklad systému číslovania je znázornený v dodatku č. I k validačnej správe (4).

16. Zásobné médium sa používa ako základ pre obohatené a mraziace médium. Obohatené médium je potrebné na kultiváciu buniek. Mraziace médium je osobitne určené na umožnenie mrazenia buniek na dlhodobé skladovanie bez akýchkoľvek účinkov. Pred použitím by sa malo NuSerum (alebo porovnateľné sérum s rovnakými vlastnosťami, u ktorého sa preukázalo, že produkuje údaje v súlade s požiadavkami na efektívnosť testu a kontrolu kvality), ktoré je zložkou obohateného média, analyzovať na koncentrácie T a E2 v pozadí. Príprava týchto roztokov sa popisuje v dodatku č. II k validačnej správe (4).

([1]) ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA, [http://www.lgcstandards-atcc.org/].

▼M5

17. Po aktivácii bunkovej kultúry H295R z pôvodnej série ATCC by sa bunky mali namnožiť pre päť pasáží (t. j. bunky sa delia štyri krát). Bunky z piatej pasáže sa potom zmrazia v tekutom dusíku na uskladnenie. Pred zmrazením buniek sa vzorka buniek z predchádzajúcej štvrtej pasáže otestuje na platničke na kontrolu kvality (pozri odseky 36 a 37) na overenie, či základná produkcia hormónov a reakcia na pozitívne kontrolné chemikálie spĺňajú kritériá kontroly kvality skúšky vymedzené v tabuľke 5.

18. Bunky H295R sa musia kultivovať, mraziť a uskladňovať v tekutom dusíku, aby boli k dispozícii bunky vhodnej pasáže/veku na kultiváciu a použitie. Maximálny počet pasáží po prevzatí novej ([1]) alebo zmrazenej ([2]) série buniek na kultiváciu, ktorý je prijateľný na použitie v skúške H295R, by mal byť najviac 10. Napríklad prijateľné pasáže pre kultúry buniek zo série zmrazenej v pasáži 5 by boli od 4.5 do 10.5. V prípade buniek aktivovaných z týchto zmrazených sérií sa dodržuje postup popísaný v odseku 19. Tieto bunky by sa pred svojím použitím v testovaní mali kultivovať najmenej štyri (4) ďalšie pasáže (pasáž 4.5).

Štartovacie bunky zo zmrazených zásob

19. Postup na aktiváciu buniek zo zmrazených zásob sa použije, keď sa na účely kultivácie a testovania vyberie nová séria buniek zo zásob uskladnených v tekutom dusíku. Podrobné informácie pre tento postup sa uvádzajú v dodatku č. III k validačnej správe (4). Bunky sa vyberú z tekutého dusíka, rýchlo sa rozmrazia, vložia sa v obohatenom médiu do odstredivkovej skúmavky, odstredia sa pri izbovej teplote, resuspendujú sa v obohatenom médiu a prenesú sa do kultivačnej banky. Médium by sa malo ďalší deň vymeniť. Bunky H295R sa kultivujú v inkubátore pri 37 °C vo vzdušnej atmosfére s 5 %CO_2 a médium sa mení za nové dva- až trikrát za týždeň. Keď sú bunky konfluentné na približne 85 až 90 %, mali by sa deliť. Delenie buniek je potrebné na zabezpečenie zdravia a rastu buniek a na zachovanie buniek na vykonávanie biologických testov. Bunky sa trikrát opláchnu s fosfátovo tlmivým fyziologickým roztokom (PBS bez Ca^{2+} Mg^{2+}) a uvoľnia sa z kultivačnej banky pridaním vhodného oddeľujúceho enzýmu, napr. trypsínu, do fosfátovo tlmivého roztoku (bez Ca^{2+} Mg^{2+}). Ihneď po oddelení buniek od kultivačnej banky by sa enzymatická reakcia mala zastaviť pridaním obohateného média v trojnásobnom pomere k objemu použitému na enzymatickú úpravu. Bunky sa vložia do odstredivkovej skúmavky, odstredia sa pri izbovej teplote, odstráni sa supernatant a peleta buniek sa resuspenduje v obohatenom médiu. Vhodné množstvo bunkového roztoku sa umiestni do novej kultivačnej banky. Množstvo bunkového roztoku by sa malo upraviť tak, aby boli bunky konfluentné do 5 až 7 dní. Odporúčaný subkultivačný pomer je 1:3 až 1:4. Platnička by sa mala starostlivo označiť. Bunky sú teraz pripravené na použitie v skúške a nadbytočné bunky by sa mali zmraziť v tekutom dusíku, ako sa opisuje v odseku 20.

([1]) „Nová séria“ označuje čerstvú sériu buniek z ATCC.

([2]) „Zmrazená séria“ označuje bunky, ktoré boli predtým kultivované a zmrazené v laboratóriu inom než ATCC.

▼M5

Mrazenie buniek H295R (príprava buniek na uskladnenie v tekutom dusíku)

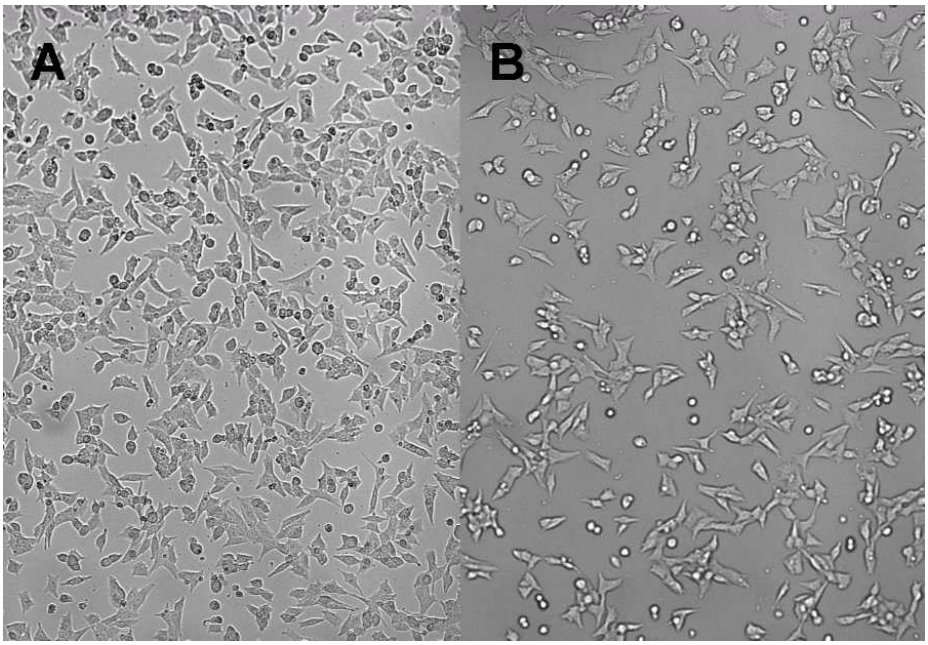
20. Pri príprave buniek H295R na zmrazenie sa dodržuje postup popísaný vyššie v súvislosti s delením buniek až po krok resuspendácie pelety buniek na dne odstredivkovej skúmavky. Tu sa peleta buniek resuspenduje v mraziacom médiu. Roztok sa prenesie do kryogenickej nádobky, príslušne sa označí a mrazí sa pri – 80 °C po dobu 24 hodín, potom sa kryogenická nádobka prenesie do tekutého dusíku na uskladnenie. Podrobné informácie o tomto postupe sa uvádzajú v dodatku č. III k validačnej správe (4).

Platničky a predinkubácia buniek na testovanie

21. Potrebný počet 24-jamkových platničiek pripravených podľa opisu v odseku 19 závisí od počtu testovaných chemikálií a konfluencie buniek v kultivačných miskách. Spravidla jedna kultivačná banka (75 cm^2) s bunkami konfluentnými na 80 až 90 % poskytne dostatok buniek pre jednu až 1,5 (24-jamkovú) platničku v cieľovej hustote 200 000 až 300 000 buniek na ml média, z čoho vyplýva približne 50 až 60 % konfluencia v jamkách po 24 hodinách (obrázok č. 2). To je typicky optimálna hustota buniek na produkciu hormónov v skúške. Pri vyšších hustotách sa mení charakteristika produkcie T a aj E2. Pred prvým vykonaním skúšky sa odporúča testovanie rôznych hustôt nasadenia od 200 000 do 300 000 buniek na ml a hustota, ktorá povedie k 50 – 60 % konfluencii v jamke po 24 hodinách, sa vyberie pre ďalšie skúšky.

Obrázok č. 2

Fotomikrograf buniek H295R pri hustote nasadenia 50 % na 24-jamkovej kultivačnej platničke po 24 hodinách vyhotovený na kraji (A) a v strede (B) jamky



22. Médium sa pipetou odoberie z kultivačnej banky a bunky sa trikrát prepláchnu sterilným fosfátovo tlmivým fyziologickým roztokom (bez $Ca^{2+}Mg^{2+}$). Na oddelenie buniek od kultivačnej banky sa pridá enzymatický roztok (vo fosfátovo tlmivom fyziologickom roztoku). Po vhodnom čase na oddelenie buniek by sa enzymatická reakcia mala zastaviť pridaním obohateného média v trojnásobnom pomere k objemu použitému na enzymatickú úpravu Bunky sa vložia do odstredivkovej skúmavky, odstredia sa pri

▼M5

izbovej teplote, odstráni sa supernatant a peleta buniek sa resuspenduje v obohatenom médiu. Hustota buniek sa vypočíta s použitím napr. hemocytometra alebo počítadla buniek. Bunkový roztok by sa mal rozriediť na želanú očkovaciu hustotu a poriadne premiešať na zaistenie homogénnej hustoty buniek. Bunky by sa mali na platničky vkladať s 1 ml bunkového roztoku na jamku a platničky a misky sa označia. Nasadené platničky sa inkubujú pri 37 °C vo vzdušnej atmosfére s obsahom menej ako 5 % CO_2 po dobu 24 hodín, aby sa bunky mohli prichytiť k jamkám.

POŽIADAVKY NA KONTROLU KVALITY

23. Je dôležité, aby sa do jamiek počas dávkovania dali presné množstvá roztokov a vzoriek, pretože tieto objemy určujú koncentrácie použité pri výpočte výsledkov skúšky.

24. Pred začatím kultivácie buniek a následným testovaním by každé laboratórium malo preukázať citlivosť svojho systému merania hormónov (odseky 29 až 31).

25. Keď sa majú použiť skúšky na meranie hormónov založené na protilátkach, testované chemikálie by sa pred začatím testovania mali analyzovať na potenciál narušiť systém merania použitý na kvantifikáciu T a E2, ako sa popisuje v odseku 32.

26. DMSO je odporúčané rozpúšťadlo pre skúšku. Ak sa použije iné rozpúšťadlo, mali by sa určiť tieto faktory:

— rozpustnosť testovanej chemikálie, forskolínu a prochlorazu v rozpúšťadle; a

— cytotoxicita ako funkcia koncentrácie rozpúšťadla.

Odporúča sa, aby maximálna prípustná koncentrácia rozpúšťadla nepresiahla 10-násobné rozriedenie najmenej cytotoxickej koncentrácie rozpúšťadla.

27. Pred prvým testovaním by laboratórium malo vykonať kvalifikačný pokus na preukázanie, že laboratórium je schopné udržať a dosiahnuť vhodnú bunkovú kultúru a podmienky skúšky potrebné na testovanie chemikálií, ako sa popisuje v odsekoch 33 až 35.

28. Pri začatí testovania novej série buniek by sa pred použitím novej série buniek najprv mala otestovať kontrolná platnička, aby sa posúdilo správanie buniek, ako sa popisuje v odsekoch 36 a 37.

Systém merania hormónov

Citlivosť metódy, správnosť, presnosť a krížová reaktivita so vzorovou matricou

29. Každé laboratórium môže na analýzu produkcie T a E2 bunkami H295R používať systém merania hormónov podľa vlastného výberu, pokiaľ spĺňa kritériá vykonávania vrátane limitu kvantifikácie. Nominálne to sú 100 pg/ml pre T a 10 pg/ml pre E2 založené na základných hormonálnych úrovniach pozorovaných vo validačných štúdiách. Môžu však byť vhodné aj väčšie alebo nižšie úrovne v závislosti od základných hormonálnych úrovní dosiahnutých vo vykonávajúcom laboratóriu. Kým laboratórium začne testy na platničkách na kontrolu kvality a skúšobné pokusy, malo by preukázať, že skúškou hormónov, ktorá sa má použiť, sa môžu merať koncentrácie hormónov v obohatenom médiu so správnosťou a

▼M5

presnosťou dostatočnými na dodržanie kritérií kvality kontroly stanovených v tabuľkách 1 a 5 analyzovaním obohateného média s vnútornou kontrolou hormónov. Do obohateného média by sa mali pridať najmenej tri koncentrácie z každého hormónu (napr. 100, 500 a 2 500 pg/ml T; 10, 50 a 250 pg/ml E2; alebo sa pre najnižšie obohacovacie koncentrácie T a E2 môžu použiť najnižšie možné koncentrácie založené na detekčných limitoch zvoleného systému merania hormónov) a potom sa analyzujú. Namerané koncentrácie hormónov v neextrahovaných vzorkách by mali byť do 30 % nominálnych koncentrácií a variabilita opakovaných meraní rovnakej vzorky by nemala presiahnuť 25 % (pozri aj tabuľku 8, v ktorej sa uvádzajú ďalšie kritériá kontroly kvality). Ak sú splnené tieto kritériá kontroly kvality, predpokladá sa, že zvolená skúška merania hormónov je dostatočne správna, presná a nemá krížovú reakciu so zložkami v médiu (vzorová matrica) tak, žeby sa očakávalo významne ovplyvnenie výsledku skúšky. V takomto prípade sa nevyžaduje extrakcia vzoriek pred meraním hormónov.

30. V prípade, že kritériá kontroly kvality v tabuľkách 1 a 8 nie sú splnené, môže nastať významný matricový účinok, a mala by sa vykonať skúška s extrahovaným doplneným médiom. Príklad postupu extrakcie je popísaný v dodatku č. II k validačnej správe (4). Koncentrácie hormónov v extrahovaných vzorkách by sa mali merať trojmo. ([1]) Ak sa dá dokázať, že zložky média po extrakcii nenarúšajú metódu zisťovania hormónov v zmysle vymedzení kritérií kontroly kvality, všetky ďalšie skúšky by sa mali vykonať s použitím extrahovaných vzoriek. Ak po extrakcii nie je možné splniť kritériá kontroly kvality, použitý systém merania hormónov nie je vhodný na účely skúšky steroidogenézy H295R a mala by sa použiť iná metóda zisťovania hormónov.

Štandardná krivka

31. Koncentrácie hormónov kontrolných vzoriek s aplikáciou rozpúšťadla by sa mali pohybovať v lineárnej časti štandardnej krivky. Hodnoty kontrol s aplikáciou rozpúšťadla by sa podľa možnosti mali nachádzať v strede lineárnej časti, aby bolo možné merať indukciu a inhibíciu syntézy hormónov. Primerane sa zvolia riedenia média (alebo extrakty), ktoré sa majú merať. Lineárny vzťah sa určí vhodným štatistickým postupom.

Test interferencie chemikálií

32. Ak sa majú na meranie hormónov použiť skúšky založené na protilátkach, ako napríklad enzýmatická imunosorbentná analýza ELISA a rádioimunologické skúšky (RIA), každá chemikália by sa pred začatím skutočného testovania chemikálií mala otestovať na možnú interferenciu so systémom merania hormónov [dodatok č. III k validačnej správe (4)], pretože niektoré chemikálie môžu narúšať tieto testy (17). Ak nastane interferencia, ktorá je ≥ 20 % základnej hormonálnej produkcie pre T a/alebo E2 podľa stanovenia analýzou hormónov, mal by sa vykonať test interferencie pri skúške pôsobenia chemikálií na hormóny [ako sa popisuje v dodatku č. III k validačnej správe (4) oddiel 5.0] vo všetkých riedeniach zásobných roztokov

([1]) *Poznámka:* Ak sa požaduje extrakcia, vykonajú sa tri opakované merania pre každý extrakt. Každá vzorka sa extrahuje len raz.

▼M5

testovaných chemikálií na určenie prahovej dávky, pri ktorej nastane interferencia (≥ 20 %). Ak je interferencia menšia ako 30 %, výsledky možno upraviť o interferenciu. Ak interferencia presahuje 30 %, údaje sú neplatné a údaje z týchto koncentrácií by sa mali vyradiť. Ak nastane významná interferencia testovanej chemikálie so systémom merania hormónov pri viac ako jednej necytotoxickej koncentrácii, mal by sa použiť iný systém merania hormónov. V záujme zamedzenia interferencie kontaminujúcich chemikálií sa odporúča, aby sa hormóny extrahovali z média s použitím vhodného rozpúšťadla, možné metódy možno nájsť vo validačnej správe (4).

Tabuľka 1

Kritériá pre systémy merania hormónov

Parameter	Kritérium
Citlivosť metódy merania	Limit kvantifikácie (LOQ – Limit of quantification) T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml ([a])
Účinnosť extrakcie hormónov (len v prípade potreby extrakcie)	Priemerné miery výťažnosti (na základe trojitých meraní) v prípade doplnených množstiev hormónov by sa nemali od dodaného množstva odchyľovať o viac než 30 %.
Interferencia chemikálie (len v prípade systémov založených na protilátkach)	Nemala by nastať žiadna významná (≥ 30 % základnej produkcie príslušného hormónu) krížová reakcia so žiadnym hormónom produkovaným bunkami ([b]) ([c])

([a]) *Poznámka:* Limity metódy merania vychádzajú z hodnôt základnej produkcie hormónov uvedených v tabuľke 5 a sú založené na výsledkoch. Ak je možné dosiahnuť vyššiu základnú produkciu hormónov, limit môže byť väčší.

([b]) Niektoré protilátky T a E2 môžu mať pri vyšších percentuálnych podieloch krížovú reakciu s androstendiónom a estrónom. V takýchto prípadoch nie je možné správne určiť účinky na 17β-HSD. Údaje však môžu aj tak poskytnúť užitočné informácie o účinkoch na všeobecnú produkciu estrogénu alebo androgénu. V takýchto prípadoch by sa údaje mali vyjadriť ako reakcie androgénu/estrogénu a nie E2 a T.

([c]) Tieto zahŕňajú: cholesterol, pregnenolón, progesterón, 11-deoxykortikosterón, kortikosterón, aldosterón, 17α-pregnenolón,17α-progesterón, deoxykortizol, kortizol, DHEA, androstendión, estrón.

Skúška spôsobilosti laboratória

33. Laboratórium by malo pred testovaním neznámych chemikálií preukázať, že je spôsobilé dosiahnuť a udržať vhodné bunkové kultúry a testovacie podmienky potrebné na úspešné vykonanie skúšky, a to vykonaním skúšky spôsobilosti laboratória. Keďže vykonanie skúšky je priamo spojené s personálom laboratória, ktorý vykonáva skúšku, tieto postupy by sa mali čiastočne opakovať pri zmene personálu laboratória.

34. Táto skúška spôsobilosti sa vykoná za rovnakých podmienok uvedených v odsekoch 38 až 40 expozíciou buniek 7 zvyšujúcim sa koncentráciám silných, stredných a slabých induktorov a inhibítorov a aj negatívnym chemikáliám (pozri tabuľku 2). Medzi chemikálie, ktoré sa majú testovať, patria najmä silný induktor forskolín (č. CAS 66575-29-9); silný inhibítor prochloraz (č. CAS 67747-09-5); stredný induktor atrazín (č. CAS 1912-24-9); stredný inhibítor aminoglutetimid (č. CAS 125-84-8); slabý induktor

▼M5

(produkcia E2) a slabý inhibítor (produkcia T) bisfenol A (č. CAS 80-05-7); a negatívna chemikália ľudský choriový gonadotropín (HCG) (č. CAS 9002-61-3), ako sa uvádza v tabuľke 2. Pre všetky chemikálie sa použijú osobitné platničky a použije sa formát uvedený v tabuľke 6. Pri každom dennom testovaní chemikálií by sa mala na preukázanie spôsobilosti testovať aj jedna platnička na kontrolu kvality (tabuľka 4, odseky 36 a 37).

Tabuľka 2

Chemikálie na preukázanie spôsobilosti a expozičné koncentrácie

Chemikália na preukázanie spôsobilosti	Testovacie koncentrácie [μM]
Prochloraz	0 ([a]); 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
Forskolín	0 ([a]), 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30
Atrazín	0 ([a]); 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100
Aminoglutetimid	0 ([a]); 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100
Bisfenol 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]) Kontrola (0) s aplikáciou rozpúšťadla (DMSO), 1 μl DMSO/jamka

Vystavenie H295R pôsobeniu chemikálií na preukázanie spôsobilosti by sa počas skúšky spôsobilosti laboratória malo vykonávať na 24-jamkových platničkách. Dávkovanie je v prípade všetkých dávok testovaných chemikálií v μM. Dávky by sa mali podávať v DMSO pri 0,1 % v/v na jamku. Všetky testovacie koncentrácie by sa mali testovať v troch jamkách (tabuľka 6). Pre každú chemikáliu sa použijú osobitné platničky. Pri každom dennom testovaní by sa mala použiť aj jedna platnička na kontrolu kvality.

35. Životnosť buniek a hormóny by sa mali analyzovať podľa odsekov 42 až 46. Prahová hodnota (najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom, LOEC) a rozhodnutie o klasifikácií by sa mali vykazovať a porovnávať podľa hodnôt uvedených v tabuľke 3. Údaje sa považujú za prijateľné, keď spĺňajú LOEC a rozhodnutie o klasifikácií uvedené v tabuľke 3.

Tabuľka 3

Prahové hodnoty (LOEC) a rozhodnutie o klasifikáciách pre chemikálie na preukázanie spôsobilosti

	č. CAS	LOEC [μM]		Rozhodnutie o klasifikácii	
		T	E2	T	E2
Prochloraz	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ ([a]) (inhibícia)	+ (inhibícia)
Forskolín	66575-29-9	≤ 10	≤ 0.1	+ (indukcia)	+ (indukcia)
Atrazín	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (indukcia)	+ (indukcia)
Aminoglute-timid	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (inhibícia)	+ (inhibícia)

▼M5

	č. CAS	LOEC [μM]		Rozhodnutie o klasifikácii	
		T	E2	T	E2
Bisfenol A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (inhibícia)	+ (indukcia)
HCG	9002-61-3	n/a	n/a	negatívne	negatívne

([a]) +, pozitívne
n/a: neuplatňuje sa, keďže sa nevyskytli žiadne zmeny po vystaveniu pôsobeniu necytotoxických koncentrácií negatívnej kontrolnej vzorky.

Platnička na kontrolu kvality

36. Platnička na kontrolu kvality sa používa na overenie správania sa buniek H295R v štandardných kultivačných podmienkach a na zriadenie historickej databázy pre koncentrácie hormónov v kontrolách s aplikáciou rozpúšťadla, v pozitívnych a negatívnych kontrolných vzorkách, ako aj v iných meraniach na kontrolu kvality v priebehu času.

— Správanie buniek H295R by sa malo posudzovať s použitím platničky na kontrolu kvality pre každú novú sériu ATCC alebo pri prvom použití predtým zmrazených zásob buniek, pokiaľ sa s touto sériou buniek nevykonala skúška spôsobilosti laboratória (odseky 32 až 34).

— Platnička na kontrolu kvality poskytuje úplné posúdenie podmienok skúšky (napr. životaschopnosť buniek, kontrola s aplikáciou rozpúšťadla, negatívne a pozitívne kontrolné vzorky, ako aj variabilita v rámci skúšky a medzi skúškami) pri testovaní chemikálií a mala by byť súčasťou každého testovania.

37. Testovanie na kontrolu kvality sa vykonáva na 24-jamkovej platničke s rovnakou inkubáciou, dávkovaním, životaschopnosťou/cytotoxicitou buniek, postupmi extrakcie hormónov a analýzy hormónov, ako sú popísané v odsekoch 38 až 46 na testovanie chemikálií. Platnička na kontrolu kvality obsahuje slepé vzorky, kontroly s aplikáciou rozpúšťadla a dve koncentrácie známeho induktora (forskolín 1, 10 μM) a inhibítora (prochloraz, 0,1, 1 μM) syntézy E2 a T. Okrem toho sa vo vybraných jamkách používa MeOH ako pozitívna kontrolná vzorka na skúšku životaschopnosti/cytotoxicity. Podrobný popis rozvrhnutia platničky sa uvádza v tabuľke 4. Kritériá, ktoré sa majú splniť na platničke na kontrolu kvality, sa uvádzajú v tabuľke 5. Minimálna základná produkcia hormónov pre T a E2 by mala byť dodržaná v jamkách na kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla a aj v jamkách so slepou vzorkou.

Tabuľka 4

Rozvrhnutie platničky na kontrolu kvality na vykonanie testovania nevystavených buniek H295R a buniek vystavených známym inhibítorom (PRO = prochloraz) a stimulátorom (FOR = forskolín) produkcie E2 a T. Po ukončení skúšky expozície a odstránení média sa do všetkých jamiek MeOH pridá 70 % roztok metanolu, čo bude slúžiť ako pozitívna kontrolná vzorka cytotoxicity [pozri skúšku cytotoxicity v dodatku č. III k validačnej správe (4)]

	1	2	3	4	5	6
A	slepá vzorka ([a])	slepá vzorka ([a])	slepá vzorka ([a])	slepá vzorka ([a]) (+ MeOH) ([b])	slepá vzorka ([a]) (+ MeOH) ([b])	slepá vzorka ([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]) Bunky v jamkách so slepou vzorkou dostanú len médium (t. j. žiadne rozpúšťadlo).
([b]) Metanol (MeOH) sa pridá **po** ukončení expozície a odstránení média z týchto buniek.
([c]) Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla DMSO (1 μl/jamka).

Tabuľka 5

Kritériá pre platničku na kontrolu kvality

	T	E2
Základná produkcia hormónov pri kontrole s aplikáciou rozpúšťadla (SC)	≥ 5-krát limit kvantifikácie (LOQ)	≥ 2,5-krát LOQ
Indukcia (10 μM forskolín)	≥ 1,5-krát SC	≥ 7,5-krát SC
Inhibícia (1 μM prochloraz)	≥ 0,5-krát SC	≥ 0,5-krát SC

POSTUP EXPOZÍCIE CHEMIKÁLIÍ

38. Predinkubované bunky sa vyberú z inkubátora (odsek 21) a pred dávkovaním sa skontrolujú pod mikroskopom, či sú v dobrom stave (uchytenie, morfológia).

39. Bunky sa umiestnia do biologicky bezpečnej nádoby a obohatené médium sa odstráni a nahradí sa novým obohateným médiom (1 ml/jamka). Uprednostňovaným rozpúšťadlom pre túto testovaciu metódu je DMSO. Ak však existujú dôvody na použitie iných rozpúšťadiel, malo by sa popísať vedecké zdôvodnenie. Bunky sa vystavia testovanej chemikálii pridaním 1 μl vhodného zásobného roztoku do DMSO [pozri dodatok č. II k validačnej správe (4)] na 1 ml obohateného média (objem jamky). To povedie ku konečnej koncentrácii 0,1 % DMSO v jamkách. Na zabezpečenie dostatočného pomiešania sa všeobecne odporúča, aby sa vhodný zásobný roztok testovanej chemikálie v DMOS zmiešal na získanie želanej konečnej koncentrácie pre každú dávku s obohateným médiom a aby sa zmes pridala do každej jamky ihneď po odstránení starého média. Keď sa použije táto možnosť, koncentrácia DMSO (0,1 %) by mala byť vo všetkých jamkách konzistentná. Jamky obsahujúce dve najväčšie koncentrácie sa vizuálne s použitím stereomikroskopu posúdia na tvorbu zrazenín alebo zakalenia, čo by poukazovalo na neúplnú rozpustnosť testovanej chemikálie. Keď sa spozorujú takéto podmienky (zakalenosť, tvorba zrazenín), preskúmajú sa jamky obsahujúce dve nasledujúce menšie koncentrácie (a tak ďalej), a koncentrácie, ktoré sa úplne nerozpustili, sa vylúčia z ďalšieho hodnotenia a analýzy. Platnička sa na 48 hodín opäť vloží do inkubátora pri teplote 37 °C vo vzdušnej atmosfére s obsahom menej ako 5 % CO_2. Rozloženie platničky s testovanou chemikáliou sa uvádza v tabuľke 6. Zásoby 1 až 7 vykazujú umiestnenie zvyšujúcich sa dávok testovanej chemikálie.

▼M5

Tabuľka 6

Schéma dávkovania na vystavenie buniek H295R pôsobeniu testovaných chemikálií na 24-jamkovej platničke

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	zásoba 4	zásoba 4	zásoba 4
B	zásoba 1	zásoba 1	zásoba 1	zásoba 5	zásoba 5	zásoba 5
C	zásoba 2	zásoba 2	zásoba 2	zásoba 6	zásoba 6	zásoba 6
D	zásoba 3	zásoba 3	zásoba 3	zásoba 7	zásoba 7	zásoba 7

40. Expozičné platničky sa po 48 hodinách vyberú z inkubátora a každá jamka sa pod mikroskopom skontroluje na stav buniek (uchytenie, morfológia, stupeň konfluencie) a náznaky cytotoxicity. Médium sa z každej jamky rozdelí na dve rovnaké množstvá (každá časť približne 490 µl) a prenesie sa do dvoch samostatných nádobiek, ktoré sa príslušne označia (t. j. jedna alikvotná časť na zabezpečenie náhradnej vzorky pre každú jamku). Aby bunky nevyschli, médium sa odstraňuje a nahrádza médiom na skúšku životaschopnosti/cytotoxicity buniek podľa jednotlivých radov alebo stĺpcov. Keď sa životaschopnosť/cytotoxicita buniek nemeria ihneď, do každej bunky sa pridá 200 µl fosfátovo tlmivého roztoku s Ca^{2+} a Mg^{2+}. Média sa do ďalšieho spracovania na analýzu koncentrácií hormónov zmrazia pri teplote – 80 °C (pozri odseky 44 až 46). T a E2 v médiu udržiavanom v teplote – 80 °C sú všeobecne síce stabilné najmenej po dobu 3 mesiacov, v každom laboratóriu by sa však mala dokumentovať stabilita hormónov počas skladovania.

41. Ihneď po odstránení média sa určuje životaschopnosť/cytotoxicita buniek pre každú expozičnú platničku.

Určovanie životaschopnosti buniek

42. Zvolená skúška životaschopnosti/cytotoxicity buniek sa môže použiť na určenie potenciálneho vplyvu testovanej chemikálie na životaschopnosť buniek. Skúška by mala byť schopná poskytnúť pravdivú mieru percentuálneho podielu životaschopných buniek v jamke alebo by mala preukázať, že je priamo porovnateľná (lineárna funkcia) so skúškou Live/Dead® [pozri dodatok č. III k validačnej správe (4)]. Iná skúška, ktorá preukázateľne funguje rovnako dobre, je test MTT [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid] (18). Posúdenie životaschopnosti buniek s použitím uvedených metód je relatívne meranie, ktoré nemusí preukázať lineárne vzťahy s absolútnym počtom buniek v jamke. Preto by analytik mal vizuálne subjektívne, paralelne posúdiť každú jamku a mali by sa digitálne odfotografovať kontroly s aplikáciou rozpúšťadla a dve najväčšie necytotoxické koncentrácie, ktoré sa zaarchivujú na neskoršie posúdenie skutočnej hustoty buniek, ak by to bolo potrebné. Ak by z vizuálneho preskúmania alebo zo skúšky životaschopnosti/cytotoxicity vyplynulo zdanlivé zvýšenie počtu buniek, musí sa toto zvýšenie overiť. Keď sa zvýšenie buniek overí, malo by sa to uviesť v protokole z testu. Životaschopnosť buniek sa vyjadruje pomerne k priemernej reakcii v kontrolách s aplikáciou rozpúšťadla, ktorá sa považuje za 100 % životaschopných buniek, a vypočítava sa náležite pre použitú skúšku životaschopnosti/cytotoxicity buniek. V prípade skúšky MTT sa môže použiť tento vzorec:

▼M5

% životaschopných buniek = [reakcia v jamke – priemerná reakcia v jamkách s MeOH (= 100 % mŕtvych)] ÷ [priemerná reakcia v jamkách SC – priemerná reakcia v jamkách s MeOH (= 100 % mŕtvych)]

43. Jamky so životaschopnosťou nižšou ako 80 % v pomere k priemernej životaschopnosti v kontrolách s aplikáciou rozpúšťadla (= 100 % životaschopnosť) by sa nemali zahrnúť do konečnej analýzy údajov. Inhibícia steroidogenézy vyskytujúcej sa v prítomnosti takmer 20 % cytotoxicity by sa mala hodnotiť opatrne, aby sa zabezpečilo, že príčinou inhibície nie je cytotoxicita.

Analýza hormónov

44. Každé laboratórium môže na analýzu T a E2 použiť systém merania hormónov podľa vlastného výberu. Náhradné alikvotné časti média z každej pokusnej skupiny sa môžu použiť na prípravu roztokov tak, aby sa koncentrácia dostala do lineárnej časti štandardnej krivky. Ako sa uvádza v odseku 29, každé laboratórium by malo pred vykonaním kontroly kvality alebo testovania chemikálií preukázať súlad svojho systému merania hormónov (napr. ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) s kritériami kontroly kvality analýzou obohateného média s pridanou vnútornou kontrolnou vzorkou hormónov. Aby zložky testovacieho systému nenarúšali meranie hormónov, hormóny bude možno potrebné pred ich meraním extrahovať z média (pozri odsek 30, v ktorom sa uvádzajú podmienky, za ktorých sa extrakcia vyžaduje alebo nevyžaduje). Odporúča sa vykonať extrakciu podľa postupov uvedených v dodatku č. III k validačnej správe (4).

45. Ak sa na meranie produkcie hormónov používa komerčná testovacia súprava, analýza hormónov by sa mala vykonať podľa popisu v príručkách výrobcu testovacej súpravy. Väčšina výrobcov má špecifický postup, akým sa vykonávajú analýzy hormónov. Riedenia vzoriek sa upravia tak, aby sa očakávané koncentrácie hormónov kontrol s aplikáciou rozpúšťadla pohybovali v strede lineárnej časti štandardnej krivky individuálnej skúšky [dodatok č. III k validačnej správe (4)]. Hodnoty mimo lineárnej časti štandardnej krivky sa zavrhnú.

46. Konečné koncentrácie hormónov sa vypočítavajú takto:

Príklad:

Extrahované:	450 µl média
Rekonštituované v:	250 µl tlmivého roztoku
Testovacie riedenie:	1:10 (aby bola vzorka v lineárnej časti štandardnej krivky)
Testovacia koncentrácia hormónov:	150 pg/ml (už upravená na koncentráciu na ml testovanej vzorky)
Výťažnosť:	89 %
Konečná koncentrácia hormónov =	[Koncentrácia hormónov (na ml) ÷ výťažnosť] (faktor riedenia)
Konečná koncentrácia hormónov =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

▼M5

Výber testovacích koncentrácií

47. Skúška by sa mala nezávisle vykonať minimálne dvakrát. Pokiaľ z predchádzajúcich informácií, ako sú napríklad informácie o limitoch rozpustnosti alebo o cytotoxicite, nevyplýva základ na výber testovacích koncentrácií, odporúča sa, aby testovacie koncentrácie pre prvé vykonanie skúšky boli v intervaloch $\log_{10}$, pričom 10^{-3} M je maximálna koncentrácia. Ak je chemikália rozpustná, nie je cytotoxická pri žiadnej z testovaných koncentrácií a prvý pokus bol negatívny pre všetky koncentrácie, potom sa to potvrdí ďalším vykonaním skúšky za tých istých podmienok, za akých sa vykonal prvý pokus (tabuľka 7). Ak sú výsledky prvého pokusu nejednoznačné (t. j. násobná zmena je štatisticky významná z kontroly s aplikáciou rozpúšťadla len v jednej koncentrácii) alebo pozitívna (t. j. násobná zmena v dvoch alebo viacerých hraničiacich koncentráciách je štatisticky významná), test by sa mal opakovať, ako sa uvádza v tabuľke 7, upravením zvolených testovacích koncentrácií. Testovacie koncentrácie v druhom a treťom (v náležitých prípadoch) pokuse by sa mali upraviť na základe výsledkov koncentrácií z prvého pokusu, ktoré vyvolali účinok s použitím intervalov koncentrácií v intervaloch 1/2-log (napr. ak výsledkom pôvodného pokusu s 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1 000 μM boli indukcie pri 1 a 10 μM, koncentrácie testované pri druhom pokuse by mali byť 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100 μM), pokiaľ sa nemusia použiť nižšie koncentrácie na dosiahnutie LOEC. V druhom prípade by sa v druhom pokuse s použitím 1/2-log stupnice malo použiť najmenej päť koncentrácií menších ako najnižšia koncentrácia testovaná v prvom pokuse. Ak sa v druhom pokuse nepotvrdí prvý pokus (t. j. nenastane štatistická významnosť pri predtým pozitívne testovanej koncentrácii ± 1 zvýšenie koncentrácie), vykoná sa tretí pokus s použitím pôvodných testovacích podmienok. Nejednoznačné výsledky z prvého pokusu sa považujú za negatívne, ak v žiadnom z ďalších dvoch pokusov nie je možné potvrdiť spozorovaný účinok. Nejednoznačné výsledky sa považujú za pozitívne reakcie (účinok), keď reakciu možno potvrdiť najmenej v jednom ďalšom pokuse so zvýšením koncentrácie ± 1 (pozri oddiel 55 pre postup interpretácie údajov).

Tabuľka 7

Rozhodovacia matica pre možné výsledné scenáre

pokus 1	pokus 2		pokus 3		rozhodnutie	
scenár	rozhodnutie	scenár	rozhodnutie	scenár	pozitívne	negatívne
negatívne	potvrdené ([a])	negatívne	ukončenie			X
negatívne	potvrdené ([a])	pozitívne	upraviť ([b])	negatívne		X
nejednoznačné ([c])	upraviť ([b])	negatívne	potvrdené ([a])	negatívne		X
nejednoznačné ([c])	upraviť ([b])	negatívne	potvrdené ([a])	pozitívne	X	
nejednoznačné ([c])	upraviť ([b])	pozitívne			X	
pozitívne	upraviť ([b])	negatívne	potvrdené ([a])	pozitívne	X	

▼M5

pokus 1	pokus 2		pokus 3		rozhodnutie	
scenár	rozhodnutie	scenár	rozhodnutie	scenár	pozitívne	negatívne
negatívne	potvrdené [a]	pozitívne	upraviť [b]	pozitívne	X	
pozitívne	upraviť [b]	pozitívne	ukončenie		X	

[a] Potvrdenie predchádzajúceho pokusu s použitím rovnakých podmienok pokusu.
[b] Opätovné vykonanie skúšky v intervaloch koncentrácie 1/2-log (vymedzenie koncentrácie, ktorá v predchádzajúcom pokuse bola významne iná).
[c] Násobná zmena v jednej koncentrácii je štatisticky významne odlišná od kontroly s aplikáciou rozpúšťadla.

Kvalita kontroly testovacej platničky

48. Okrem splnenia kritérií pre platničku na kontrolu kvality treba splniť ďalšie kritériá kvality, ktoré sa týkajú prijateľnej variability medzi replikovanými jamkami, opakovanými pokusmi, linearitou a citlivosťou systémov merania hormónov, variabilitou medzi opakovanými meraniami hormónov rovnakej vzorky a percentom výťažnosti vrcholov hormónov po extrakcii média (v náležitých prípadoch; pozri odsek 30 pre požiadavky na extrakciu) a ktoré sa uvádzajú v tabuľke 8. Údaje by sa mali pohybovať v rámci prijateľných rozsahov vymedzených pre každý parameter, ktorý sa posudzuje na ďalšie hodnotenie. Ak tieto kritériá nie sú splnené, v pracovnom hárku treba poznamenať, že kritériá kontroly kvality neboli u predmetnej vzorky splnené, a vzorka by sa mala opäť analyzovať alebo vyradiť zo súboru údajov.

Tabuľka 8

Prijateľné rozsahy a/alebo variabilita (%) pre parametre testovacej platničky skúšky H295R

(LOQ: limit kvantifikácie systému merania hormónov. CV: variačný koeficient; SC: kontrola s aplikáciou rozpúšťadla; DPM: dezintegrácia za minútu)

	Porovnanie medzi	T	E2
Základná produkcia hormónov v SC	Násobne väčšia ako LOQ	≥ 5-násobne	≥ 2,5-násobne
Expozičné pokusy – CV v rámci platničky pre SC (replikované jamky)	Absolútne koncentrácie	≤ 30 %	≤ 30 %
Expozičné pokusy – CV medzi platničkami pre SC (opakované pokusy)	Násobná zmena	≤ 30 %	≤ 30 %
Systém merania hormónov – citlivosť	Zistiteľné násobné zníženie v pomere k SC	≥ 5-násobne	≥ 2,5-násobne
Systém merania hormónov – CV opakovaného merania pre SC [a]	Absolútne koncentrácie	≤ 25 %	≤ 25 %
Extrakcia média – výťažnosť vnútorného štandardu 3H (v náležitých prípadoch)	DPM	≥ 65 % nominálne	

[a] Vzťahuje sa na opakované merania rovnakej vzorky.

▼M5

ANALÝZA ÚDAJOV A PODÁVANIE SPRÁV

Analýza údajov

49. Na hodnotenie relatívneho zvýšenia/zníženia chemicky zmenenej produkcie hormónov by sa výsledky mali normalizovať na strednú hodnotu SC každej testovacej platničky a výsledky by sa mali vyjadriť ako zmeny v pomere k SC na každej testovacej platničke. Všetky údaje sa vyjadria ako stredná hodnota ± 1 štandardná odchýlka (SD).

50. Do analýzy údajov by sa mali začleniť len údaje o hormónoch z jamiek, v ktorých bola cytotoxicita menšia ako 20 %. Relatívne zmeny by sa mali vypočítavať takto:

Relatívna zmena = (koncentrácia hormónov v každej jamke) ÷ (stredná koncentrácia hormónov vo všetkých jamkách na kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla).

51. Ak by z vizuálneho preskúmania jamky alebo zo skúšky životaschopnosti/cytotoxicity popísanej v odseku 42 vyplynulo zdanlivé zvýšenie počtu buniek, musí sa toto zvýšenie overiť. V prípade, že sa zvýšenie buniek overí, malo by sa to uviesť v protokole z testu.

52. Pred vykonaním štatistických analýz by sa mali posúdiť predpoklady normality a homogénnosti odchýlok. Normalita by sa mala hodnotiť pomocou štandardných diagramov pravdepodobnosti alebo inej vhodnej štatistickej metódy (napr. Shapirov-Wilkov test). Ak údaje (násobné zmeny) nie sú normálne distribuované, malo by sa usilovať o transformáciu údajov na priblíženie sa normálnej distribúcii. Ak sú údaje normálne distribuované alebo sa blížia normálnej distribúcii, rozdiely medzi skupinami koncentrácií chemikálií a kontrolami s aplikáciou rozpúšťadla by sa mali analyzovať s použitím parametrického testu (napr. Dunnettov test), pričom koncentrácia je nezávislá premenná a reakcia (násobná zmena) je závislá premenná. Ak údaje nie sú normálne distribuované, mal by sa použiť vhodný neparametrický test (napr. Kruskalov Wallisov test, test Steela Many-one rank). Rozdiely sa považujú za významné, ak je $p \leq 0,05$. Štatistické vyhodnotenia sa vykonávajú na základe priemerných hodnôt pre každú jamku, ktoré predstavujú nezávislé opakované dátové body. Predpokladá sa, že pre veľké odstupy medzi dávkami v prvom pokuse (stupnica $\log_{10}$) nebude v mnohých prípadoch možné popísať jasné vzťahy medzi koncentráciou a reakciou, keď najväčšie dve dávky budú v lineárnej časti esovitej krivky. Preto sa v prípade prvého pokusu alebo iných súborov údajov, kde sa vyskytuje tento stav (napr. keď nemožno odhadnúť maximálnu účinnosť), použije štatistika pevnej premennej typu I, ako sa už opísalo.

53. Ak v lineárnej časti krivky ležia viac ako dva dátové body a keď možno vypočítať maximálne účinnosti – ako sa predpokladá pre niektoré z druhých pokusov, ktoré sa vykonali s použitím pologaritmických rozostupov medzi expozičnými koncentráciami –, mal by sa na výpočet účinných koncentrácií (napr. EC50 a EC20) použiť probitový, logitový alebo iný vhodný regresný model.

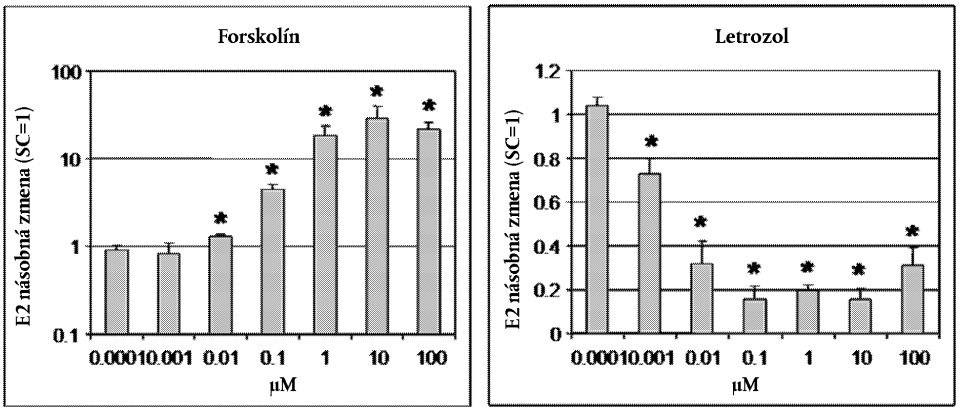
54. Výsledky by sa mali uviesť graficky (stĺpcové grafy predstavujúce strednú hodnotu ± 1 SD) a v tabuľkovom formáte (LOEC/NOEC, smer účinku a sila maximálnej reakcie, ktorá je súčasťou časti údajov o vzťahu medzi dávkou a reakciou) (pozri ako príklad obrázok č. 3) Posúdenie údajov sa považuje za platné, len ak bolo založené na najmenej dvoch nezávisle vykonaných pokusoch. Pokus sa považuje za nezávislý, ak sa vykonal v iný deň s použitím nového súboru roztokov a kontrol. Rozpätie koncentrácií použitých v druhých a tretích pokusoch (ak boli potrebné) sa môže prispôsobiť na základe výsledkov prvého pokusu, aby bol lepšie vymedzený rozsah pre vzťah medzi dávkou a reakciou s LOEC (pozri odsek 47).

▼M5

Obrázok č. 3

Príklad prezentácie a hodnotenia údajov získaných počas vykonania skúšky H295R v grafickom a tabuľkovom formáte.

Hviezdičky označujú štatisticky významné rozdiely v porovnaní s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla ($p < 0,05$). LOEC: najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom; maximálna zmena: maximálna sila reakcie pozorovanej pri akejkoľvek koncentrácii v pomere k priemernej reakcii SC (= 1)



Chemikália	LOEC	Maximálna zmena
Forskolín	0,01	0,15-násobná
Letrozol	0,001	29-násobná

Postup interpretácie údajov

55. Testovaná chemikália sa považuje za pozitívnu, ak je násobná indukcia štatisticky odlišná ($p \leq 0,05$) od kontroly s aplikáciou rozpúšťadla pri dvoch hraničiacich koncentráciách v najmenej dvoch nezávislých pokusoch (tabuľka č. 7). Testovaná chemikália sa považuje za negatívnu po dvoch nezávislých negatívnych pokusoch alebo po troch pokusoch, z ktorých sú dva negatívne a jeden nejednoznačný alebo pozitívny. Ak údaje z troch nezávislých pokusov nespĺňajú rozhodovacie kritériá uvedené v tabuľke 7, výsledky pokusov nemožno interpretovať. Výsledky dosiahnuté pri koncentráciách, ktoré presahujú limity rozpustnosti, alebo pri cytotoxických koncentráciách by sa nemali začleniť do interpretácie výsledkov.

Správa z testu

56. Správa z testu by mala obsahovať tieto informácie:

Testovacie zariadenie

— názov zariadenia a jeho sídlo;

— riaditeľ štúdie a ostatní zamestnanci a ich úlohy v štúdii;

— dátumy začiatku a konca štúdie;

▼**M5**

Testovaná chemikália, reagenty a kontrolné vzorky

— totožnosť (názov alebo č. CAS), zdroj, číslo dávky/série, čistota, dodávateľ a charakterizácia testovanej chemikálie, reagentov a kontrolných vzoriek;

— fyzická povaha a náležité fyzikálnochemické vlastnosti testovanej chemikálie;

— podmienky skladovania a metóda a frekvencia prípravy testovaných chemikálií, reagentov a kontrolných vzoriek;

— stabilita testovanej chemikálie;

Bunky

— zdroj a typ buniek;

— počet pasáží (identifikátor bunkovej pasáže) buniek použitých v teste;

— popis postupov na udržanie bunkových kultúr;

Požiadavky pred testom (ak sa uplatňuje)

— popis a výsledky testu interferencie chemikálie so skúškou hormónov;

— popis a výsledky meraní účinnosti extrakcie hormónov;

— štandardná a kalibračná krivka pre všetky analytické skúšky, ktoré sa majú vykonať;

— detekčné limity pre zvolené analytické skúšky;

Podmienky testu

— zloženie médií;

— koncentrácia testovanej chemikálie;

— hustota buniek (odhadovaná alebo meraná koncentrácia buniek po 24 a 48 hodinách);

— rozpustnosť testovanej chemikálie (hranica rozpustnosti, ak je stanovená);

— inkubačná doba a podmienky;

Výsledky testu

— základné údaje pre každú jamku pre kontrolné vzorky a testované chemikálie – každé opakované meranie vo forme pôvodných údajov z nástroja použitého na meranie produkcie hormónov (napr. OD, fluorescenčné jednotky, DPM atď.);

— validácia normality alebo vysvetlenie transformácie údajov;

— stredné hodnoty reakcií ± 1 SD pre každú meranú jamku;

— údaje o cytotoxicite (testovacie koncentrácie, ktoré spôsobili cytotoxicitu);

— potvrdenie, že boli splnené požiadavky na kontrolu kvality;

▼M5

— relatívna zmena v porovnaní s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla upravená o cytotoxicitu;

— stĺpcový graf znázorňujúci relatívnu (násobnú) zmenu v jednotlivých koncentráciách, SD a štatistickú významnosť podľa odsekov 49 až 54;

Interpretácia údajov

— uplatnenie postupu interpretácie údajov na výsledky a diskusia o zisteniach;

Diskusia

— Vyplývajú zo štúdie nejaké náznaky týkajúce sa možnosti, že údaje o T/E2 by mohli byť ovplyvnené nepriamymi účinkami na dráhy glukokortikoidov a mineralokortikoidov?

Záver

LITERATÚRA

1. OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, v dodatku 2 ku kapitole B.54 v tejto prílohe.

2. Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 217, 114 - 124.

3. Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidgenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res*., 14, 23 - 30.

4. OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paríž. Dostupné na: [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, Paríž. Dostupné na: [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, Dostupné na: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf].

7. Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.,* 81, 78 - 89.

8. Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 182, 44 - 54.

9. Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.,* 118: 265 - 272.

▼**M5**

10. Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.,* 17:1137 - 1148.

11. Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.,* 50, 5488 - 5496.

12. He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere,* 80:578 - 584.

13. Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.,* 39:2777 - 2785.

14. Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.,* 17:1137 - 1148.

15. Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* 77, 731 - 737.

16. Chapter B.55 of this Annex: 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

Dodatok

VYMEDZENIA POJMOV

Konfluencia označuje prekrytie alebo proliferáciu, ktoré sú bunkám umožnené cez kultivačné médium alebo v kultivačnom médiu.

Chemikália je látka alebo zmes.

CV označuje variačný koeficient, ktorý sa vymedzuje ako pomer štandardnej odchýlky distribúcie k jej aritmetickej strednej hodnote.

CYP označuje cytochróm P450 monooxygenázy, čo je skupina génov a enzýmov z nich produkovaných, ktoré katalyzujú širokú škálu biochemických reakcií vrátane syntézy a metabolizmu steroidných hormónov.

DPM je dezintegrácia za minútu. Je to počet atómov v danom množstve rádioaktívneho materiálu, o ktorom sa zistilo, že sa rozložil za jednu minútu.

E2 je 17β-estradiol, čo je najdôležitejší estrogén v cicavčích systémoch.

Bunky **H295R** sú bunky ľudského adrenokarcinómu, ktoré majú fyziologické charakteristiky buniek zonálne nediferencovaných ľudských fetálnych nadobličiek a ktoré exprimujú všetky enzýmy steroidogenézy. Dostupné sú z ATCC.

Mraziace médium sa používa na zmrazenie a uskladnenie zmrazených buniek. Tvorí ho zásobné médium plus BD NuSerum a dimetylsulfoxid.

Lineárna časť je časť štandardnej krivky pre systém merania hormónov, kde sú výsledky úmerné koncentrácii analytu prítomného vo vzorke.

LOQ je limit kvantifikácie a označuje najnižšie množstvo chemikálie, pri ktorom možno v rámci stanovenej hranice spoľahlivosti rozpoznať rozdiel od absencie tejto chemikálie (prázdna hodnota). Na účely tejto metódy LOQ zvyčajne vymedzuje výrobca testovacích systémov, ak sa neustanovuje inak.

LOEC je najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom, pri ktorej je reakcia kúšky štatisticky odlišná od reakcie skúšky pri kontrole s aplikáciou rozpúšťadla.

NOEC je koncentrácia bez pozorovaného účinku, čo je najvyššia testovaná koncentrácia, keď zo skúšky nevyplýva pozitívna reakcia.

Pasáž je počet delení buniek po aktivácii kultúry zo zmrazenej zásoby. Prvej pasáži, ktorá sa začala zo zmrazených zásob, sa priradí číslo jedna (1). Bunky, ktoré sa oddelili jedenkrát, sa označia pasáž 2 atď.

PBS je Dulbeccov fosfátovo tlmivý fyziologický roztok.

Kontrola kvality označuje merania potrebné na zaručenie platných údajov.

Platnička na kontrolu kvality je 24-jamková platnička, ktorá obsahuje dve koncentrácie pozitívnych a negatívnych kontrolných vzoriek na sledovanie správania novej dávky buniek alebo na zabezpečenie pozitívnych kontrolných vzoriek pre skúšku pri testovaní chemikálií.

Pokus je nezávislý pokus charakterizovaný novým súborom roztokov a kontrolných vzoriek.

▼**M5**

Zásobné médium je základ na prípravu ostatných reagentov. Tvorí ho 1:1 zmes Dulbeccovho modifikovaného Eaglovho média a Hamovej zmesi živín F-12 (DMEM/F12) v 15 mM HEPES tlmivom roztoku bez fenolovej červene a hydrogénuhličitanu sodného. Hydrogénuhličitan sodný sa pridáva ako tlmivý roztok, pozri dodatok č. II k validačnej správe (4).

Obohatené médium tvorí zásobné médium plus BD NuSerum a zmes ITS+ premium, pozri dodatok č. II k validačnej správe (4).

Steroidogenéza je syntetická dráha, ktorá vedie od cholesterolu k rôznym steroidným hormónom. Niektoré prostredné hormóny v syntéze steroidov, ako napríklad progesterón a testosterón, sú samé osebe dôležité hormóny, ale slúžia aj ako prekurzory hormónov v ďalšej časti syntetickej dráhy.

T označuje testosterón, jeden z dvoch najdôležitejších androgénov v cicavčích systémoch.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Testovacia platnička je platnička, na ktorej sa bunky H295R vystavia pôsobeniu testovaných chemikálií. Testovacie platničky obsahujú kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla a testovanú chemikáliu trojmo v siedmich koncentráciách.

Trypsín 1X je zriedený roztok enzýmu trypsín, čo je pankreatická serínová proteáza a používa sa na uvoľnenie buniek z platničky na kultiváciu buniek, pozri dodatok č. III k validačnej správe (4).

▼M5

B.58. **TRANSGÉNNA SKÚŠKA GÉNOVEJ MUTÁCIE NA SOMATICKÝCH BUNKÁCH HLODAVCOV A SKÚŠKA GÉNOVEJ MUTÁCIE NA ZÁRODOČNÝCH BUNKÁCH**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 488 (2013). Testovacie metódy EÚ sú dostupné pre široký okruh skúšok mutácie in vitro, ktorými možno odhaliť chromozomálne a/alebo génové mutácie. Existujú testovacie metódy pre sledované parametre in vivo (t. j. chromozomálne aberácie a neplánovaná syntéza DNA), pomocou nich však nie je možné merať génové mutácie.Transgénne skúšky mutácie na bunkách hlodavcov (Transgenic Rodent – TGR) uspokojujú potreby praktických a všeobecne dostupných testov génových mutácií in vivo.

2. Skúšky mutácie TGR sa značne revidovali (24) (33). Využívajú sa pri nich transgénne potkany a myši, ktoré obsahujú viaceré kópie chromozálne integrovaných plazmidových alebo fágových dvojfunkčných vektorov (shuttle vektory). Prenesené gény obsahujú reportérové gény na detekciu rôznych typov mutácií vyvolaných testovanými chemikáliami in vivo.

3. Mutácie vyskytujúce sa v hlodavcoch sa hodnotia získaním preneseného génu a analýzou fenotypu reportérového génu v bakteriálnom hostiteľovi, ktorému chýba reportérový gén. Skúškami génovej mutácie TGR sa merajú mutácie spôsobené v geneticky neutrálnych génoch získaných prakticky z akéhokoľvek tkaniva hlodavca. Tieto skúšky preto obchádzajú mnohé z existujúcich limitácií spojených so štúdiou in vivo génovej mutácie v endogénnych génoch (napr. obmedzené tkanivá vhodné na analýzu, negatívna/pozitívna selekcia vo vzťahu k mutáciám).

4. Z váhy dôkazov vyplýva, že prenesené gény reagujú na mutagénny podobne ako endogénne gény, najmä pokiaľ ide o detekciu bázových zámen, mutácií spôsobujúcich posun čítacieho rámca a malé delécie a včlenenia (24).

5. Na medzinárodných seminároch o testovaní genotoxicity (IWGT) sa podporilo začlenenie skúšok génových mutácií TGR na zisťovanie génových mutácií in vivo a odporučil sa protokol na ich vykonávanie (15) (29). Táto testovacia metóda je založená na týchto odporúčaniach. Ďalšie analýzy podporujúce používanie tohto protokolu možno nájsť v (16).

6. Predpokladá sa, že v budúcnosti bude možné skombinovať skúšku génovej mutácie TGR so štúdiou toxicity po opakovanej dávke (kapitola B.7 tejto prílohy). Sú však potrebné údaje na uistenia sa, či citlivosť skúšky génovej mutácie TGR nebola ovplyvnená kratším jednodňovým časovým úsekom od konca doby podávania do času odberu vzoriek, ktorý sa používa v štúdii toxicity po opakovanej dávke, v porovnaní s 3 dňami používanými v skúškach génovej mutácie TGR. Tiež sú potrebné údaje na preukázanie, že výsledky skúšky po opakovanej dávke nie sú nepriaznivo ovplyvnené použitím transgénnych kmeňov hlodavcov namiesto použitia tradičných kmeňov hlodavcov. Keď budú tieto údaje dostupné, táto testovacia metóda sa upraví.

7. Vymedzenia základných pojmov sa uvádza v dodatku.

▼M5

ÚVODNÉ ÚVAHY

8. Skúšky génovej mutácie TGR, pre ktoré sú dostupné dostatočné údaje na podporu ich využitia v tejto testovacej metóde, sú: lacZ bakteriofágové myši (Muta™Mouse); lacZ plazmidové myši; gpt delta (gpt a Spi⁻) myši a potkany; lacI myši a potkany (Big Blue®), vykonávané za štandardných podmienok. Ďalej sa môže na hodnotenie mutácií v modeloch Big BlueÒ a MutaäMouse použiť skúška pozitívnej selekcie cII. Mutagenéza v modeloch TGR sa normálne posudzuje ako frekvencia mutácií, ak sa však požaduje, môže molekulárna analýza mutácií poskytnúť ďalšie informácie (pozri odsek 24).

9. Tieto testy in vivo génovej mutácie na hlodavcoch sú osobitne významné na posudzovanie mutagénneho rizika, keďže reakcie skúšok závisia od metabolizmu in vivo, farmakokinetiky, procesu obnovy DNA a translézie syntézy DNA, hoci tie sa môžu líšiť medzi jednotlivými druhmi, tkanivami a typmi poškodenia DNA. Skúška in vivo génových mutácií je užitočná na ďalšie skúmanie mutagénneho účinku zisteného systémom in vitro a na sledovanie výsledkov testov s použitím iných sledovaných parametrov in vivo (24). Okrem toho, že génová mutácia je kauzálne spojená s indukciou rakoviny, je relevantným sledovaným parametrom na predikciu nerakovinových chorôb založených na mutáciách v somatických tkanivách (12) (13), ako aj chorôb prenášaných zárodočnou líniou.

10. Ak existujú dôkazy, že testovaná chemikália alebo relevantný metabolit nedosiahne žiadne príslušné tkanivo, nie je vhodné vykonať skúšku génovej mutácie TGR.

PRINCÍP TESTU

11. V skúškach popísaných v odseku 8 má cieľový gén bakteriálny alebo bakteriofágový pôvod a na získanie z genómovej DNA hlodavcov sa prenesený gén začlení do λ bakteriofágového alebo plazmidového dvojfunkčného vektora. Postup zahŕňa extrakciu genómovej DNA z príslušného tkaniva hlodavca, spracovanie genómovej DNA in vitro (t. j. spájanie λ vektorov alebo ligácia a elektroporácia plazmidov na získanie dvojfunkčného vektora) a následné zisťovanie mutácií v bakteriálnych hostiteľoch vo vhodných podmienkach. V skúške sa využívajú neutrálne prenesené gény, ktoré možno jednoducho získať z väčšiny tkanív.

12. Základný pokus génovej mutácie TGR zahŕňa podávanie chemikálie hlodavcom počas určitého obdobia. Chemikálie možno podávať akýmkoľvek vhodným spôsobom, a to aj vrátane implantácie (napr. testovanie s lekárskym prístrojom). Celkové obdobie, počas ktorého sa zvieraťu dávajú dávky sa nazýva doba podávania. Po podávaní zvyčajne nasleduje pred usmrtením časové obdobie, počas ktorého sa chemikália nepodáva a počas ktorého sa neobnovené lézie DNA fixujú do stabilných mutácií. V literatúre sa toto obdobie rôzne nazýva aj ako čas prejavov, čas fixácie alebo čas expresie; koniec tohto obdobia je čas odberu vzoriek (15) (29). Po usmrtení zvieraťa sa genómová DNA izoluje z príslušného tkaniva a prečistí sa.

▼M5

13. Údaje z jedného tkaniva z jedného zvieraťa z viacerých spojení/ligácií sa zvyčajne agregujú a všeobecne sa hodnotí frekvencia mutácií s použitím súčtu od 10^5 do 10^7 jednotiek tvoriacich plaky alebo jednotiek tvoriacich kolónie. Keď sa používajú metódy pozitívnej selekcie, celkový počet jednotiek tvoriacich plaky sa určí s osobitným súborom neselektívnych platničiek.

14. Metódy pozitívnej selekcie sa vypracovali na uľahčenie zisťovania mutácií v gpt géne [gpt delta myši a potkany, gpt $^-$ fenotyp (20) (22) (28)] a lacZ géne [Muta™Mouse alebo lacZ plazmidové myši (3) (10) (11) (30)]; pričom génové mutácie lacI vo zvieratách Big Blue® sa zisťujú pomocou neselektívnej metódy, ktorou sa identifikujú mutácie prostredníctvom tvorby sfarbených (modrých) plakov. Metodológia pozitívnej selekcie funguje aj na určenie bodových mutácií vznikajúcich v cII géne λ bakteriofágového dvojfunkčného vektora [Big Blue® myši alebo potkany, a Muta™Mouse (17)] a delečných mutácií v λ červených a gam génoch [Spi $^-$ selekcia v gpt delta myšiach a potkanoch (21) (22) (28)]. Frekvencia mutácií sa vypočítava vydelením počtu plakov/plazmidov obsahujúcich mutácie v prenesenom géne celkovým počtom plakov/plazmidov získaných z tej istej vzorky DNA. V štúdiách génovej mutácie TGR je frekvencia mutácií vykazovaným parametrom. Frekvencia mutácií sa ďalej môže určiť ako podiel buniek s nezávislými mutáciami; tento výpočet si vyžaduje úpravu klonovej expanzie sekvenciou zotavených mutantov (24).

15. Mutácie hodnotené v skúškach lacI, lacZ, cII a bodovej mutácie gpt pozostávajú hlavne z mutácií bázovej zámeny, mutácií posúvajúcich čítací rámec a z malých včlenení/delécií. Relatívny podiel týchto typov mutácií v spontánnych mutáciách je podobný ako ich relatívny podiel v endogénnom géne Hprt. Veľké delécie sa zisťujú výhradne so skúškami selekcie Spi $^-$ a plazmidov lacZ (24). Zaujímavé mutácie sú mutácie in vivo, ktoré vznikajú v myšiach alebo potkanoch. Mutácie in vitro a ex vivo, ktoré môžu vzniknúť počas získania, replikácie alebo opravy fágu/plazmidu sú pomerne zriedkavé a v niektorých systémoch ich možno špecificky identifikovať alebo vylúčiť pomocou systému bakteriálneho hostiteľa/pozitívnej selekcie.

OPIS METÓDY

Príprava

Výber druhov zvierat

16. V súčasnosti sú dostupné rôzne modely zisťovania génovej mutácie transgénnych myší a tieto systémy sa používajú viac ako modely využívajúce transgénne potkany. Ak je potkan jednoznačne vhodnejším modelom ako myš (napr. pri skúmaní mechanizmu karcinogenézy tumoru zisteného len u potkanov, na koreláciu so štúdiou toxicity na potkanoch, alebo keď je známe, že metabolizmus potkanov lepšie znázorňuje ľudský metabolizmus), malo by sa zvážiť použitie modelov využívajúcich transgénne potkany.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

17. Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by ideálne mala byť 22 °C (± 3 °C). Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 % a pokiaľ možno nemala by prevyšovať 70 % okrem času čistenia miestnosti, cieľom je udržať relatívnu vlhkosť v rozmedzí 50 – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé, denne by sa malo striedať 12 hodín svetla s 12 hodinami tmy. Na

▼M5

kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej chemikálie, keď sa podáva týmto spôsobom. Zvieratá by mali byť umiestnené v malých skupinách (najviac päť) rovnakého pohlavia, pokiaľ sa nepredpokladá agresívne správanie. Ak to je vedecky opodstatnené, zvieratá môžu byť umiestnené samostatne.

Príprava zvierat

18. Zdravé mladé, pohlavne dospelé zvieratá (staré 8 až 12 týždňov na začiatku pokusu) sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Zvieratá sa jedinečneoznačia. Zvieratá sa aklimatizujú na laboratórne podmienky najmenej päť dní. Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy vyplývajúce z umiestnenia klietok. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variácia zvierat minimálna a nemala by presiahnuť ± 20 % strednej hmotnosti každého pohlavia.

Príprava dávok

19. Pevné testované chemikálie by sa pred podávaním dávok zvieratám mali rozpustiť alebo suspendovať vo vhodných rozpúšťadlách alebo nosičoch alebo primiešať do krmiva alebo pitnej vody. Kvapalné testované chemikálie sa podávajú priamo alebo rozriedené pred podávaním. V prípade inhalačných expozícií sa testované chemikálie môžu v závislosti od svojich fyzikálnochemických vlastností podávať ako plyn, výpary alebo tuhé/kvapalné aerosóly. Používajú sa čerstvé prípravky testovanej chemikálie, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na vhodnosť uskladnenia.

Podmienky skúšky

Rozpúšťadlo/nosič

20. Rozpúšťadlo/nosič by nemali vyvolávať toxické účinky v používaných objemoch dávok a nemali by chemicky reagovať s testovanou chemikáliou. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by malo byť podporené referenčnými údajmi, ktoré poukazujú na ich kompatibilitu. Vždy, keď to je možné, odporúča sa zvážiť použitie najprv vodného rozpúšťadla/nosiča.

Pozitívne kontrolné vzorky

21. Obyčajne by sa mali používať zvieratá na paralelnú pozitívnu kontrolu. V prípade laboratórií, ktoré preukázali spôsobilosť (pozri odsek 23) a bežne používajú tieto skúšky, sa však na potvrdenie úspechu metódy môžu do každej štúdie začleniť DNA z pokusných zvierat z predchádzajúcich pozitívnych kontrol. Tieto DNA z predchádzajúcich pokusov by mali byť získané z rovnakých druhov a príslušných tkanív a mali by byť vhodne uskladnené (pozri odsek 36). Keď sa používajú paralelné pozitívne kontrolné vzorky, nie je potrebné podávať ich rovnakým spôsobom ako testovanú chemikáliu; o pozitívnych kontrolných vzorkách by však malo byť známe, že spôsobujú mutácie v jednom tkanive alebo vo viacerých tkanivách, ktoré sú relevantné pre testovanú chemikáliu. Dávky pozitívnych kontrolných chemikálií by sa mali zvoliť tak, aby spôsobovali slabé alebo mierne účinky, ktoré kriticky stanovujú výsledky a citlivosť skúšky. Príklad pozitívnych kontrolných chemikálií a niektorých ich cieľových tkanív sa uvádzajú v tabuľke 1.

▼M5

Tabuľka 1

Príklady pozitívnych kontrolných chemikálií a niektorých ich cieľových tkanív

Pozitívna kontrolná chemikália a č. CAS	Názov Einecs a č. Einecs	Charakteristika	Cieľové tkanivo mutácie	
			potkan	myš
N-etyl-N-nitrozmočovina (č. CAS 759-73-9)	N-etyl-N-nitrozmočovina (212-072-2)	priamo pôsobiaci mutagén	pečeň, pľúca	kostná dreň, hrubé črevo, epitel hrubého čreva, tenké črevo, pečeň, pľúca, slezina, obličky, vaječníkové folikulárne bunky, samčie zárodočné bunky
etylkarbamát (uretán) (č. CAS 51-79-6)	uretán (200-123-1)	mutagén, vyžaduje metabolizmus alebo spôsobuje len slabé účinky.		kostná dreň, predžalúdok, tenké črevo, pečeň, pľúca, slezina
2,4-diaminotoluén (č. CAS 95-80-7)	4-metyl-m-fenylén-diamín (202-453-1)	mutagén, vyžaduje metabolizmus, pozitívny aj v skúške Spi$^-$	pečeň	pečeň
benzo[a]pyrén (č. CAS 50-32-8)	benzo[def]chryzén (200-028-5)	mutagén, vyžaduje metabolizmus	pečeň, omentum	kostná dreň, prsia, hrubé črevo, predžalúdok, žľaznatý žalúdok, srdce, pečeň, pľúca, samčie zárodočné bunky

Negatívne kontrolné vzorky

22. Pre každý čas odberu vzoriek by sa mali začleniť negatívne kontrolné vzorky ošetrované len s rozpúšťadlom alebo nosičom, s ktorými sa inak zaobchádza rovnako ako s pokusnými skupinami. Ak neexistujú historické alebo zverejnené kontrolné údaje, ktoré by preukazovali, že zvolené rozpúšťadlo/nosič nespôsobujú žiadne zhubné ani mutagénne účinky, neošetrované kontrolné vzorky by sa mali zaradiť aj pre každý čas odberu vzoriek na stanovenie prijateľnosti kontrolnej skupiny, ktorej bol podaný nosič.

Overenie spôsobilosti laboratória

23. Spôsobilosť v týchto skúškach by sa mala určiť preukázaním schopnosti reprodukovať predpokladané výsledky zo zverejnených údajov (24) pre: 1) frekvencie mutácií s pozitívnymi kontrolnými chemikáliami (vrátane slabých reakcií), ako sa napríklad uvádzajú v tabuľke 1, s nemutagénnymi kontrolami a kontrolami s podávaním nosiča; a 2) získanie preneseného génu z genómovej DNA (napr. účinnosť spájania).

Sekvenovanie mutácií

24. Pokiaľ ide o uplatňovanie noriem, sekvenovanie DNA mutácií sa nevyžaduje, najmä v prípadoch, keď sa získa jasný pozitívny alebo negatívny výsledok. Údaje o sekvenovaní však môžu byť užitočné v prípade spozorovania vysokej variácie medzi jednotlivcami. V takýchto prípadoch sa sekvenovanie môže použiť na vylúčenie možnosti výnimočných (jackpots) alebo klonových udalostí identifikáciou podielu jedinečných mutácií z konkrétneho tkaniva. Sekvenovanie približne 10 mutácií na jedno tkanivo na jedno zviera by malo postačovať na jednoduché určenie, či klonové mutácie zvyšujú frekvenciu mutácií; sekvenovanie až 25 mutácií môže

▼M5

byť potrebné na matematickú korekciu frekvencie mutácií o klonalitu. Sekvenovanie mutácií sa môže zvážiť aj v prípade zistenia malých zvýšení frekvencie mutácií (t. j. ktoré len presahujú hodnoty neošetrovanej kontrolnej skupiny). Rozdiely v spektre mutácií medzi kolóniami mutácií a pokusnými a kontrolnými zvieratami môžu potvrdiť mutagénny účinok (29). Mutačné spektrá môžu byť užitočné aj na vývoj mechanistických hypotéz. Keď sa má sekvenovanie začleniť ako súčasť protokolu z testu, musí sa osobitne dbať na plán týchto štúdií, najmä pokiaľ ide o počet sekvenovaných mutácií na vzorku, aby sa dosiahla dostatočná výpovedná hodnota podľa použitého štatistického modelu (pozri odsek 43).

POSTUP

Počet zvierat a ich pohlavie

25. Počet zvierat v skupine by sa mal vopred určiť tak, aby bol dostatočne štatisticky významný na zistenie aspoň zdvojenia vo frekvencii mutácií. Skupiny by mali pozostávať najmenej z piatich zvierat, ak je však štatistická výpovedná hodnota nedostatočná, počet zvierat by sa mal príslušne zvýšiť. Bežne by sa mali používať samce. Môžu sa vyskytnúť prípady, keď je opodstatnené testovanie len samičiek, napríklad pri testovaní liekov určených pre ženy alebo pri skúmaní ženského/samičieho metabolizmu. Ak existujú medzi pohlaviami významné rozdiely, pokiaľ ide o toxicitu alebo metabolizmus, potrebné sú samce a aj samice.

Obdobie podávania

26. Na základe pozorovaní, že mutácie pribúdajú s každým ošetrením, je potrebný režim s opakovanou dávkou s dennými ošetreniami počas obdobia 28 dní. Všeobecne sa to považuje za prijateľné na produkciu dostatočnej akumulácie mutácií slabými mutagénmi a aj na zabezpečenie času vystavenia dostačujúceho na zistenie mutácií v orgánoch s pomalou proliferáciou. Pre niektoré hodnotenia môžu byť vhodné alternatívne režimy podávania a tieto iné rozvrhy podávania by mali byť v protokole vedecky odôvodnené. Ošetrovania by nemali byť kratšie ako čas potrebný na úplnú indukciu všetkých relevantných metabolizujúcich enzýmov a kratšie ošetrovania si môžu vyžadovať použitie viacerých rôznych časov odberu vzoriek, ktoré sú vhodné pre orgány s rôznymi mierami proliferácie. V každom prípade by sa pri odôvodňovaní protokolu mali použiť všetky dostupné informácie (napr. o všeobecnej toxicite alebo o metabolizme a farmakokinetike), najmä v prípade odchýlenia sa od uvedených odporúčaní. Hoci to môže zvýšiť citlivosť, čas ošetrovania dlhší ako 8 týždňov by sa mal jasne vysvetliť a odôvodniť, pretože dlhý čas ošetrovania môže klonovou expanziou spôsobiť zrejmé zvýšenie frekvencie mutácií (29).

Veľkosti dávok

27. Veľkosti dávok by mali vychádzať z výsledkov štúdie na zistenie rozsahu dávok s meraním všeobecnej toxicity, ktorá sa vykonala rovnakým spôsobom expozície, alebo z výsledkov vopred existujúcich štúdií subakútnej toxicity. Na určenie rozsahov dávok sa môžu použiť netransgénne zvieratá rovnakého kmeňa hlodavcov. V hlavnom teste by kompletná štúdia na získanie informácií o vzťahu medzi dávkou a reakciou mala zahŕňať negatívnu kontrolnú skupinu (pozri odsek 22) a minimálne tri veľkosti dávok s vhodnými rozostupmi okrem prípadov, keď bola použitá limitujúca dávka (pozri odsek 28). Najvyššia dávka by mala byť maximálna tolerovaná

▼M5

dávka (MTD). Maximálna tolerovaná dávka sa vymedzuje ako dávka produkujúca známky toxicity na takej úrovni, že vyššie úrovne dávok založené na rovnakom dávkovacom režime by pravdepodobne spôsobili letalitu. Chemikálie s osobitnými biologickými aktivitami pri nízkych netoxických dávkach (ako napríklad hormóny a mitogény) a chemikálie, ktoré vykazujú saturáciu toxikokinetických vlastností, môžu byť vyňaté z kritérií na stanovenie dávok a mali by sa hodnotiť prípad od prípadu. Veľkosti dávok by mali pokrývať rozsah od maximálnej po malú, resp. žiadnu toxicitu.

Limitný test

28. Ak z pokusov na zistenie rozsahu alebo z existujúcich údajov týkajúcich sa súvisiacich kmeňov hlodavcov vyplýva, že režim podávania aspoň limitujúcej dávky (pozri nižšie) nespôsobuje žiadne pozorovateľné toxické účinky, a ak sa genotoxicita neočakáva ani na základe údajov zo štrukturálne príbuzných chemikálií, nepovažuje sa za nevyhnutné uskutočniť celú štúdiu s použitím troch veľkostí dávok. V prípade obdobia podávania v trvaní 28 dní (t. j. 28 denných podaní) je limitujúca dávka 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň. V prípade obdobia podávania kratšieho ako 14 dní je limitujúca dávka 2 000 mg/kg telesnej váhy/deň (rozvrhy dávok iné než 28 denných podaní by mali byť v protokole vedecky odôvodnené, pozri odsek 26).

Podávanie dávok

29. Testovaná chemikália sa zvyčajne podáva plnením žalúdka sondou s použitím žalúdočnej rúrky alebo vhodnej intubačnej kanyly. Pri plánovaní skúšky by sa všeobecne mal zvážiť predpokladaný spôsob expozície ľudí. Preto môžu byť prijateľné iné spôsoby expozície (ako napríklad pitná voda, subkutánne, intravenózne, lokálne, inhalácia, intratracheálne, strava alebo implantácia), keď ich možno odôvodniť. Intraperitoneálna injekcia sa neodporúča, keďže to nie je fyziologicky relevantný spôsob expozície ľudí. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže naraz podávať sondou alebo injekciou závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Objem by nemal byť väčší ako 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Požitie objemov väčších ako uvedený by malo byť opodstatnené. Okrem dráždivých alebo žieravých chemikálií, ktoré bežne odhalia zhoršené účinky pri vyšších koncentráciách, by sa variabilita testovacieho objemu mala minimalizovať upravením koncentrácie na zabezpečenie stáleho objemu pri všetkých veľkostiach dávok.

Čas odberu vzoriek

Somatické bunky

30. Čas odberu vzoriek je kritickou premennou, keďže ho určuje doba potrebná na fixáciu mutácií. Táto doba závisí od tkaniva a zrejme súvisí s dobou zmeny bunkovej populácie, pričom kostná dreň a tenké črevo reagujú rýchlo a pečeň reaguje omnoho pomalšie. Vhodným kompromisom na meranie frekvencií mutácií v tkanivách s rýchlou a aj pomalou proliferáciou sú denné režimy podávania po dobu 28 po sebe nasledujúcich dní (ako sa uvádza v odseku 26) a odber vzoriek tri dni po záverečnom podaní, hoci maximálna frekvencia mutácií sa v tkanivách s pomalou proliferáciou za týchto podmienok nemusí prejaviť. Ak sú tkanivá s pomalou proliferáciou osobitne významné, môže byť vhodnejší neskorší čas odberu vzoriek v trvaní 28 dní nasledujúci po období podávania v trvaní 28 dní (16) (29). V takýchto prípadoch by neskorší čas odberu vzoriek nahradil čas odberu vzoriek 3 dni a vyžadoval by si vedecké odôvodnenie.

▼M5

Zárodočné bunky

31. Skúšky TGR sú vhodné na skúmanie indukcie génovej mutácie v mužských zárodočných bunkách (7) (8) (27), v ktorých sú dobre vymedzené časové rozvrhnutie a kinetika spermatogenézy (27). Nízky počet vajíčok dostupných na analýzu, dokonca aj po superovulácii, a skutočnosť, že v oocyte nie je syntéza DNA, vylučujú určenie mutácie v ženských zárodočných bunkách s použitím transgénnych skúšok (31).

32. Časy odberu vzoriek mužských zárodočných buniek by mali byť zvolené tak, aby sa odobrala vzorka z celého rozsahu exponovaných typov buniek v celom vývoji zárodočných buniek a aby stupeň, na ktorý je odber vzoriek zameraný, bol vystavený dostatočnej expozícii. Čas prechodu vyvíjajúcich sa zárodočných buniek zo spermatogoniálnych kmeňových buniek na dospelé spermie, ktoré sa dostanú do semenovodu/chvosta semenníka, je ~49 dní u myší (36) a ~70 dní u potkanov (34) (35). Po 28-dňovej expozícii s následnou dobou 3 dní odberu vzoriek predstavujú naakumulované spermie zhromaždené zo semenovodu/chvosta semenníka (7) (8) populáciu buniek exponovaných počas približne druhej polovice spermatogenézy, čo zahŕňa meiotické a postmeiotické obdobie, ale nie obdobie spermatogonálnych buniek alebo obdobie kmeňových buniek. Na primeraný odber vzoriek buniek v semenovode/chvoste semenníka, ktoré boli spermatogonálnymi kmeňovými bunkami počas obdobia expozície, je po skončení podávania potrebný ďalší čas na odber vzoriek v trvaní minimálne 7 týždňov (myši) alebo 10 týždňov (potkany).

33. Bunky extrudované zo semenotvorných tubulov po režime 28 + 3 dni tvoria zmiešanú populáciu obohatenú o všetky stupne vyvíjajúcich sa zárodočných buniek (7) (8). Odber vzoriek z týchto buniek na zistenie génovej mutácie neposkytuje také presné posúdenie stupňov, v ktorých boli indukované mutácie zárodočných buniek, aké možno získať z odberu vzoriek spermií zo semenovodu/chvostu semenníka (keďže tam sú rôzne typy zárodočných buniek, z ktorých sa odobrali vzorky z tubulov, a bude tam niekoľko somatických buniek, ktoré kontaminujú túto populáciu buniek). Odber vzoriek zo semenotvorných tubulov spoločne so spermiami zo semenovodu/chvostu semenníka len v režime 28 + 3 dní by však určitým spôsobom pokryl bunky exponované vo väčšine fáz vývoja zárodočných buniek a mohol by byť užitočný na zistenie určitých mutagénov zárodočných buniek.

Pozorovania

34. Najmenej raz denne je nutné uskutočniť všeobecné klinické pozorovania, najlepšie vždy v tom istom čase s ohľadom na časový vrchol očakávaných účinkov po podaní. Mal by sa zaznamenať zdravotný stav zvierat. Najmenej dvakrát denne je potrebné sledovať chorobnosť a úmrtnosť zvierat. Všetky zvieratá by sa mali vážiť najmenej raz za týždeň a pri usmrtení. Spotreba potravy by sa mala merať aspoň raz týždenne. Ak sa testovaná chemikália podáva vo vode na pitie, spotreba vody by sa mala merať pri každej výmene vody a aspoň raz za týždeň. Zvieratá, ktoré vykazujú neletálne ukazovatele nadmernej toxicity, by mali byť usmrtené pred dokončením testovacieho obdobia (23).

▼M5

Zhromažďovanie tkaniva

35. Treba jasne vymedziť odôvodnenie zhromažďovania tkanív. Keďže indukciu mutácie je možné skúmať prakticky v každom tkanive, výber zhromažďovaných tkanív by mal byť založený na dôvode vykonania štúdie a na akýchkoľvek existujúcich údajoch o mutagenite, karcinogenite alebo toxicite skúmanej chemikálie. Medzi dôležité posudzované faktory patrí spôsob podávania (založený na pravdepodobnom spôsobe expozície ľudí), predpokladaná tkanivová distribúcia a možný mechanizmus účinku. Ak neexistujú žiadne podkladové informácie, mali by sa zhromažďovať viaceré somatické tkanivá, ktoré by mohli byť významné. Tie by mali predstavovať tkanivá s rýchlou proliferáciou, pomalou proliferáciou a plochy kontaktných tkanív. Okrem toho by sa mali zhromažďovať spermie zo semenovodu/chvosta semenníka a vyvíjajúce sa zárodočné bunky zo semenotvorných tubulov (ako sa opisuje v odsekoch 32 a 33), ktoré by sa mali uskladniť pre prípad, žeby bola v budúcnosti potrebná analýza mutagenity zárodočných buniek. Orgány by sa mali vážiť a v prípade väčších orgánov by sa mala zo všetkých zvierat zhromažďovať rovnaká časť.

Uskladňovanie tkanív a DNA

36. Tkanivá (alebo homogenáty tkanív) by sa mali uskladňovať pri teplote nižšej ako - 70 °C a na izoláciu DNA by sa mali použiť do 5 rokov. Izolovaná DNA, uchovávaná zmrazená pri teplote 4 °C vo vhodnom tlmivom roztoku, by sa mala na analýzu mutácií optimálne použiť do jedného roka.

Výber tkanív na analýzu mutácií

37. Výber tkanív by mal byť založený na týchto úvahách: 1) spôsob podávania alebo miesto prvého kontaktu (napr. žľaznatý žalúdok pri orálnom podávaní, pľúca pri podávaní prostredníctvom inhalácie alebo koža pri lokálnej aplikácii); a 2) farmakokinetické parametre pozorované v štúdiách všeobecnej toxicity, z ktorých vyplýva tkanivová dispozícia, retencia alebo akumulácia alebo cieľové orgány toxicity. Ak sa štúdie vykonávajú v nadväznosti na štúdie karcinogenity, mali by sa zvážiť cieľové tkanivá karcinogenity. Výberom tkanív pre analýzu by sa mala maximalizovať detekcia chemikálií, ktoré sú priamo pôsobiacimi mutagénmi in vitro, ktoré sa rýchlo metabolizujú, sú vysoko reaktívne alebo sa zle absorbujú alebo u ktorých je cieľové tkanivo určené spôsobom podávania (6).

38. Ak neexistujú podkladové informácie a po zvážení miesta kontaktu vyplývajúceho zo spôsobu podávania by sa mali na mutagenitu posudzovať pečeň a najmenej jedno rýchlo sa deliace tkanivo (napr. žľaznatý žalúdok, kostná dreň). Vo väčšine prípadov možno uvedené požiadavky splniť analýzou dvoch starostlivo vybraných tkanív, ale v niektorých prípadoch môžu byť potrebné tri alebo viaceré tkanivá. Ak existujú dôvody na osobitné znepokojenie s ohľadom na účinky na zárodočné bunky vrátane pozitívnych reakcií v somatických bunkách, mali by sa tkanivá zárodočných buniek hodnotiť na mutácie.

Metódy merania

39. Na detekciu mutácií sú dostupné štandardné laboratórne alebo zverejnené metódy pre odporúčané transgénne modely: lacZ lambda bakteriofág a plazmid (30); lacI myši (2) (18); gpt delta myši (22); gpt delta potkany (28); cII (17). Zmeny by mali byť opodstatnené a riadne zdokumentované. Údaje z viacerých spojení možno agregovať a použiť na dosiahnutie primeraného počtu plakov alebo kolónií. Keď je však na dosiahnutie primeraného počtu plakov potrebný väčší počet spájacích reakcií, môže to byť znak nekvalitnej DNA. V týchto prípadoch by sa údaje mali posudzovať opatrne, pretože môžu byť nespoľahlivé. Optimálny celkový počet plakov alebo

▼M5

kolónií na vzorku DNA určuje štatistická pravdepodobnosť zistenia dostatočného počtu mutácií pri danej frekvencii spontánnych mutácií. Vo všeobecnosti je potrebných minimálne 125 000 až 300 000 plakov, ak je frekvencia spontánnych mutácií v ráde 3×10^{-5} (15). V prípade skúšky Big Blue® lacI je dôležité preukázať, že možno zistiť celý rad fenotypov farebných mutácií začlenením vhodných farebných kontrol súbežne s každým očkovaním. Tkanivá a výsledné vzorky (položky) by sa mali spracúvať a analyzovať s použitím blokového dizajnu, v rámci ktorého sa položky z kontrolnej skupiny používajúcej nosič/rozpúšťadlo, z pozitívnej kontrolnej skupiny (ak sa používa) alebo z pozitívnej kontrolnej DNA (v náležitých prípadoch) a z každej pokusnej skupiny spracúvajú spoločne.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

40. Údaje o jednotlivých zvieratách sa uvádzajú v tabuľkovej forme. Pokusnou jednotkou je jedno zviera. Správa by mala obsahovať celkový počet jednotiek tvoriacich plaky (pfu) alebo jednotiek tvoriacich kolónie (cfu), počet mutácií a frekvenciu mutácií pre každé tkanivo z každého zvieraťa. V prípade viacerých spájacích/záchranných reakcií treba uviesť počet reakcií na vzorku DNA. Treba síce uchovávať údaje pre každú jednotlivú reakciu, vykazujú sa však len celkové jednotky tvoriace plaky a jednotky tvoriace kolónie. Treba vykazovať údaje o toxicite a o klinických príznakoch podľa odseku 34. Mali by sa predkladať všetky výsledky sekvenovania pre každú analyzovanú mutáciu a mali by sa uviesť výpočty vyplývajúcej frekvencie mutácií pre každé zviera a tkanivo.

Štatistické vyhodnocovanie a interpretácia výsledkov

41. Je viacero kritérií na určenie pozitívneho výsledku, ako je zvýšenie frekvencie mutácií súvisiace s dávkou alebo jasné zvýšenie frekvencie mutácií v skupine s jednou dávkou v porovnaní s kontrolnou skupinou používajúcou rozpúšťadlo/nosič. Na zabezpečenie dostatočných údajov na analýzu vzťahu medzi dávkou a reakciou treba analyzovať najmenej tri pokusné skupiny. Biologická relevantnosť výsledkov by síce mala byť prvoradá, pri vyhodnocovaní výsledkov testov sa však ako pomôcka môžu použiť vhodné štatistické metódy (4) (14) (15) (25) (26). V použitých štatistických testoch by sa malo zviera posudzovať ako pokusná jednotka.

42. Testovaná chemikália, ktorej výsledky nespĺňajú uvedené kritériá v žiadnom tkanive, sa v tejto skúške nepovažuje za mutagénnu. Pre biologickú relevantnosť negatívneho výsledku treba potvrdiť expozíciu tkaniva.

43. Pre sekvenčné analýzy DNA sú dostupné viaceré štatistické postupy, ktoré pomáhajú pri interpretácii výsledkov (1) (5) (9) (19).

44. Zváženie toho, či sú pozorované hodnoty v rozsahu historickej kontroly alebo mimo nej, môže poskytnúť usmernenie pri hodnotení biologického významu reakcie (32).

▼M5

Správa z testu

45. Správa z testu by mala obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— identifikačné údaje a číslo CAS, ak je známe;

— zdroj, číslo dávky, ak je k dispozícii;

— fyzikálna povaha a čistota;

— fyzikálnochemické vlastnosti relevantné na vykonanie štúdie;

— stabilita testovanej chemikálie, ak je známa;

Rozpúšťadlo/nosič:

— odôvodnenie voľby nosiča;

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa;

— príprava zloženia krmiva, pitnej vodyalebo inhalácie;

— analytické určenie zložení (napr. stabilita, homogénnosť, nominálne koncentrácie);

Pokusné zvieratá:

— použité druhy/kmeň a odôvodnenie voľby;

— počet, vek a pohlavie zvierat;

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.;

— hmotnosť jednotlivých zvierat na začiatku testu vrátane rozsahu telesnej hmotnosti, strednej hodnoty a štandardnej odchýlky pre každú skupinu;

Podmienky testu:

— údaje o pozitívnych a negatívnych (rozpúšťadlo/nosič) kontrolných skupinách;

— údaje zo štúdie na zistenie rozsahu;

— odôvodnenie výberu veľkosti dávky;

— podrobné údaje o príprave testovanej chemikálie;

— podrobné údaje o podávaní testovanej chemikálie;

— odôvodnenie spôsobu podávania;

— metódy merania toxicity zvierat vrátane, keď to je možné, histopatologických alebo hematologických analýz, a frekvencia pozorovaní a vážení zvierat;

— metódy overovania, či testovaná chemikália dosiahla cieľové tkanivo alebo všeobecnú cirkuláciu, ak sa dosiahnu negatívne výsledky;

▼M5

— skutočná dávka (mg/kg telesnej hmotnosti/deň) vypočítaná z koncentrácie testovanej chemikálie (ppm) v krmive/pitnej vode a zo spotreby krmiva/pitnej vody, ak sa uplatňuje;

— podrobné údaje o kvalite krmiva a vody;

— podrobný popis rozvrhov podávania a odoberania vzoriek a odôvodnenie volieb;

— metóda eutanázie;

— postupy izolácie a uchovávania tkanív;

— metódy izolácie genómovej DNA hlodavcov, získavania preneseného génu z genómovej DNA a prenášania transgénnej DNA na bakteriálneho hostiteľa;

— zdroj a čísla dávok všetkých buniek, súprav a reagentov (v náležitých prípadoch);

— metódy vyčísľovania mutácií;

— metódy molekulárnej analýzy mutácií a použitie pri korekcii o klonalitu a/alebo metódy výpočtu frekvencie mutácií, ak sa uplatňujú;

Výsledky:

— stav zvieraťa pred testovaním a počas obdobia testovania vrátane príznakov toxicity;

— váha tela a orgánov pri usmrtení;

— pre každé tkanivo/zviera počet mutácií, počet hodnotených plakov alebo kolónií, frekvencia mutácií;

— pre každé tkanivo/skupinu zvierat počet spájacích reakcií na vzorku DNA, celkový počet mutácií, stredná frekvencia mutácií, štandardná odchýlka;

— vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je možné ho určiť;

— pre každé tkanivo/zviera počet nezávislých mutácií a stredná frekvencia mutácií, keď sa vykonala molekulárna analýza mutácií;

— paralelné a historické údaje o negatívnych kontrolných skupinách s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami;

— paralelné údaje o pozitívnych kontrolných skupinách (alebo o neparalelných DNA pozitívnych kontrolách);

— analytické určenia, ak sú k dispozícii (napr. koncentrácie DNA použité v spájaní, údaje o sekvenovaní DNA);

— použité štatistické analýzy a metódy;

Rozbor výsledkov

Záver

▼M5

LITERATÚRA

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 M*utations’ *Nature*, 377(6550): 657 - 659.

4. Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), ‘Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice’, *Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246 - 255.

5. Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), ‘Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency’, *Environ. Mol. Mutagen,* 28: 405 - 413.

6. Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), ‘Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens’, *Mutagenesis*, 14(1): 141 - 151.

7. Douglas, G.R.,J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper(1995), ‘Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice’, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7485 - 7489.

8. Douglas, G.R*.,* J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), ‘Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells’, *Mutation Res.*, 388(2-3): 197 - 212.

9. Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), ‘Bayesian Analysis of Mutational Spectra’, *Genetics*, 156: 1411 - 1418.

10. Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg(1989), ‘Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations’ *in vivo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 86(20): 7971–7975.

11. Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), ‘A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli H*ost’, *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 M*utations in a Bacteriophage λ Transgene Target', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17): 9073 - 9078.

18. Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), 'The Use of Transgenic Mice for Short-term, in vivo Mutagenicity Testing', Genet. Anal. Tech. Appl., 7(8): 212 - 218.

19. Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), 'Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis', Carcinogenesis, 29(4): 772 - 778.

20. Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), 'A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi – and 6-thioguanine Selections', Environ. Mol. Mutagen., 28(4): 465 - 470.

21. Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), 'Spi $^-$ Selection: an Efficient Method to Detect γ-ray-induced Deletions in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen*., 34(1): 9 - 15.

22. Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), 'Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays', *Mutation Res.*, 455(1–2): 191 -215.

23. OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, N^{o}19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paríž.

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, Paríž.

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 T*ransgenic 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, s. 391 - 410.

▼**M5**

31. Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), 'A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells', *Mutation Res*., 578(1 - 2): 117 -123.

32. Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), 'Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data', Mutation Res., doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.

33. OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, N^{o} 145, ENV/JM/MO-NO(2011)20, OECD, Paríž.

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, s. 1071 - 1148.

36. Russell, L.B. (2004), 'Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse', Genetica, 122: 25 - 36.

▼M5

Dodatok

VYMEDZENIA POJMOV

Obdobie podávania: celková doba, počas ktorej sa zvieraťu podáva dávka.

Bázová zámena: typ mutácie, ktorý spôsobuje nahradenie jedného nukleotidu DNA inou bázou nukleotidov DNA.

Kapsid: bielkovinový obal, ktorý obklopuje vírusovú časticu.

Chemikália: látka alebo zmes.

Klonová expanzia: produkcia mnohých buniek z jednej (mutantnej) bunky.

Jednotka tvoriaca kolónie: miera životaschopného bakteriálneho množstva.

Konkatamer: dlhá plynulá biomolekula zložená z viacerých sériovo zapojených identických kópií.

Cos-miesto: 12-nukleotidový segment jednovláknovej DNA, ktorý existuje na obidvoch koncoch dvojvláknového genómu bakteriofágovej lambdy.

Delécia: mutácia, v rámci ktorej genóm stratí jeden alebo viaceré (postupné) nukleotidy.

Elektroporácia: aplikácia elektrických impulzov na zvýšenie priepustnosti bunkových membrán.

Endogénnygén: pôvodný gén genómu.

Extrabinominálna variácia: väčšia variabilita v opakovaných odhadoch podielu populácie, ako by sa očakávala, ak by populácia mala binominálnu distribúciu.

Mutácia posúvajúca čítací rámec: genetická mutácia spôsobená včlenením alebo deléciou viacerých nukleotidov, ktorá nie je rovnomerne deliteľná tromi v rámci sekvencie DNA, ktorá kóduje bielkovinu/peptid.

Včlenenie: pridanie jedného alebo viacerých bázových párov nukleotidov do sekvencie DNA.

Jackpot: veľký počet mutantov, ktorí vznikli klonovou expanziou z jednej mutácie.

Veľké delécie: delécie v DNA viacerých tisíc báz (ktoré sa efektívne zistia skúškou selekcie Spi $^-$ a plazmidovou skúškou *lacZ*).

Ligácia: kovalentné spájanie dvoch koncov molekúl DNA s použitím ligázy DNA.

Mitogén: chemikália, ktorá stimuluje bunku, aby sa začala deliť, a ktorá spúšťa mitózu (t. j. delenie buniek).

Neutrálny gén: gén, ktorý nie je ovplyvnený tlakmi pozitívnej alebo negatívnej selekcie.

Spájanie: syntéza infekčných fágových častíc z preparátu fágových kapsidových a zadných bielkovín a konkataméru fágových molekúl DNA. Bežne sa používa na spájanie DNA klonovaných na lambda vektore (oddelený cos-miestami) do infekčných lambda častíc.

Účinnosť spájania: účinnosť, akou sa spájané bakteriofágy získajú v hostiteľskej baktérii.

▼M5

Jednotka tvoriaca plaky (pfu): miera počtu životaschopných bakteriofágov.

Bodová mutácia: všeobecný výraz pre mutáciu, ktorá ovplyvňuje len malú sekvenciu DNA vrátane malých včlenení, delécií a bázových zámen.

Pozitívna selekcia: metóda, ktorá umožňuje prežitie len mutantov.

Reportérový gén: gén, ktorého zmutovaný génový produkt možno ľahko zistiť.

Čas odberu vzoriek: koniec časového obdobia pred usmrtením, počas ktorého sa nepodáva chemikália a počas ktorého sa nespracované lézie DNA fixujú do stabilných mutácií.

Dvojfunkčný vektor (shuttle vektor): vektor zostavený tak, aby sa mohol množiť v dvoch rôznych hostiteľských druhoch; DNA vložená do dvojfunkčného vektora možno teda testovať alebo ju manipulovať v dvoch rôznych typoch buniek alebo dvoch rôznych organizmoch.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Transgénny: organizmus alebo týkajúci sa organizmu, ktorého genóm bol zmenený prenosom génu alebo génov z iných druhov.

▼M7

B.59. KOŽNÁ SENZIBILIZÁCIA *IN CHEMICO*: SKÚŠKA PRIAMEJ PEPTIDOVEJ REAKTIVITY (DPRA)

ÚVOD

Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 442C (2015). Kožný senzibilizátor je látka, ktorá po kontakte s pokožkou vyvoláva alergickú reakciu, ako sa definuje v Globálnom harmonizovanom systéme klasifikácie a označovania chemikálií (GHS) Organizácie spojených národov (OSN) (1) a v nariadení Európskej únie (ES) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (nariadenie CLP) ([1]). Táto testovacia metóda predstavuje postup *in chemico* (skúška priamej peptidovej reaktivity – DPRA), ktorá sa má použiť na podporu rozlíšenia kožných senzibilizátorov od nesenzibilizujúcich chemikálií v súlade s GHS OSN a CLP.

Existuje všeobecná zhoda, pokiaľ ide o kľúčové biologické javy, ktoré vedú ku kožnej senzibilizácii. Súčasné poznatky o chemických a biologických mechanizmoch, ktoré súvisia s kožnou senzibilizáciou, boli zhrnuté v podobe dráhy nepriaznivého účinku (AOP) (2), ktorá začína zmenami na molekulárnej úrovni cez následné pochody až po nepriaznivý účinok, a síce alergickú kontaktnú dermatitídu u ľudí alebo kontaktnú hypersenzitivitu u hlodavcov. V rámci AOP kožnej senzibilizácie je začínajúcou zmenou na molekulárnej úrovni kovalentná väzba elektrofilných látok na nukleofilné centrá v kožných proteínoch.

Posúdenie kožnej senzibilizácie zvyčajne zahŕňa použitie laboratórnych zvierat. Klasické metódy založené na morčatách, maximizačný test na morčatách podľa Magnussona a Klingmana (GPMT) a Buehlerov test [(TM B.6 (3)], sú zamerané na štúdium indukčných a elicitačných fáz kožnej senzibilizácie. Uznaný bol takisto test na myšiach, lokálna skúška lymfatických uzlín [LLNA, TM B.42 (4)] a jej dve nerádioaktívne modifikácie, LLNA: DA [TM B.50 (5)] a LLNA: BrdU-ELISA [TM B.51 (6)], z ktorých všetky slúžia výlučne na posúdenie reakcie na indukciu, keďže sú v porovnaní s testami na morčatách výhodnejšie z hľadiska dobrých podmienok zvierat a objektívneho merania indukčnej fázy kožnej senzibilizácie.

V poslednej dobe sa mechanisticky založené testovacie metódy *in chemico* a *in vitro* pokladajú za vedecky platné testovacie metódy na hodnotenie nebezpečnosti chemikálií z hľadiska kožnej senzibilizácie. Avšak vzhľadom na to, že AOP mechanicky pokrýva každú zo súčasne dostupných testovacích metód bez použitia zvierat len v obmedzenom rozsahu, budú kombinácie metód bez použitia zvierat (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*) v rámci integrovaných prístupov k testovaniu a hodnoteniu (Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA) potrebné na to, aby bolo možné súčasné testovanie na zvieratách úplne nahradiť (2) (7).

Skúška DPRA je navrhnutá tak, aby preskúmala najprv začínajúcu zmenu na molekulárnej úrovni AOP kožnej senzibilizácie, a síce reaktivitu proteínov, pomocou kvantifikácie reaktivity testovaných chemikálií voči modelovým syntetickým peptidom obsahujúcim lyzín alebo cysteín (8). Percentuálne hodnoty úbytku cysteínových a lyzínových peptidov sa potom použijú na kategorizáciu látky v jednej zo štyroch tried reaktivity na podporu rozlíšenia kožných senzibilizátorov od nesenzibilizujúcich chemikálií (9).

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006 No 1907/2006, Ú. v. EÚ L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼M7

Skúška DPRA bola validovaná vo validačnej štúdii pod vedením referenčného laboratória Európskej únie pre alternatívy testovania na zvieratách (EURL ECVAM) a následne v nezávislom partnerskom preskúmaní, ktoré vykonal vedecký poradný výbor (ESAC) EURL ECVAM, a uznaná za vedecky platnú (10) na použitie ako súčasť IATA na podporu rozlíšenia kožných senzibilizátorov od nesenzibilizujúcich chemikálií na účely klasifikácie a označovania nebezpečnosti. Príklady použitia údajov zo skúšky DPRA v kombinácii s inými informáciami sú uvedené v literatúre (11) (12) (13) (14).

Definície sa uvádzajú v dodatku I.

POČIATOČNÉ ÚVAHY, POUŽITEĽNOSŤ A OBMEDZENIA

Korelácia medzi reaktivitou proteínov a potenciálom kožnej senzibilizácie bola spoľahlivo stanovená (15) (16) (17). Keďže proteínová väzba však predstavuje len jeden kľúčový jav, a to napriek začínajúcim zmenám na molekulárnej úrovni AOP kožnej senzibilizácie, samotné informácie o reaktivite proteínov získané na základe testovacích a netestovacích metód nemusia byť dostatočné na vyvodenie záveru o neprítomnosti potenciálu chemikálií spôsobiť senzibilizáciu kože. Údaje získané na základe tejto testovacej metódy by sa preto mali zvážiť v kontexte integrovaných prístupov, ako je IATA, v kombinácii s inými doplňujúcimi informáciami, napr. pochádzajúcimi zo skúšok *in vitro*, ktorými sa skúmajú iné kľúčové prvky AOP kožnej senzibilizácie, ako aj z netestovacích metód vrátane prevzatých údajov odvodených z chemických analógov.

Túto testovaciu metódu možno použiť v kombinácii s inými doplňujúcimi informáciami na podporu rozlíšenia kožných senzibilizátorov (t. j. kategória 1 GHS OSN/CLP) od nesenzibilizujúcich chemikálií v kontexte IATA. Túto testovaciu metódu nemožno používať samostatne, a to ani pri zaraďovaní kožných senzibilizátorov do podkategórií 1A a 1B, ako sa definuje v GHS OSN/CLP, ani pri predpovedaní potenciálu na účely rozhodnutí v súvislosti s posudzovaním bezpečnosti. V závislosti od regulačného rámca však možno pozitívny výsledok získaný na základe testovacej metódy DRPA sám o sebe použiť pri klasifikácii chemikálií do kategórie 1 GHS OSN.

V prípade testovacej metódy DPRA sa preukázalo, že ju možno preniesť do laboratórií, ktoré majú skúsenosti s analýzou pomocou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC). Miera reprodukovateľnosti pri predpokladoch, ktoré možno na základe testovacej metódy očakávať, predstavuje rádovo 85 % v rámci laboratórií a 80 % medzi nimi (10). Výsledky získané vo validačnej štúdii (18) a v uverejnených štúdiách (19) celkovo indikujú, že presnosť DPRA pri odlišovaní senzibilizátorov (t. j. kategória 1 GHS OSN/CLP) od nesenzibilizujúcich chemikálií predstavuje 80 % (N = 157) s citlivosťou 80 % (88/109) a špecifickosťou 77 % (37/48) v porovnaní s výsledkami LLNA. DPRA s väčšou pravdepodobnosťou povedie k podhodnotenému predpokladu v prípade chemikálií, ktoré vykazujú nízky alebo mierny potenciál spôsobiť kožnú senzibilizáciu (t. j. podkategória 1B GHS OSN/CLP), než v prípade chemikálií vykazujúcich vysoký potenciál spôsobiť kožnú senzibilizáciu (t. j. podkategória 1A GHS OSN/CLP) (18) (19). Uvedené hodnoty presnosti DPRA ako samostatnej testovacej metódy sú však len orientačné, keďže testovacia metóda by sa mala hodnotiť v kombinácii s inými zdrojmi informácií v kontexte IATA a v súlade s ustanoveniami bodu 9. Okrem toho by sa pri hodnotení metód na zistenie kožnej senzibilizácie bez použitia zvierat malo zohľadniť to, že test LLNA ani iné testy na zvieratách nemusia v plnej miere odzrkadľovať situáciu u druhov, ktoré sú predmetom záujmu, čiže u ľudí. Na základe celkových dostupných údajov sa preukázalo, že testovaciu metódu DPRA možno použiť v prípade testovaných chemikálií, ktoré predstavujú rôzne organické funkčné skupiny, majú rôzne mechanizmy reakcie, potenciál spôsobiť kožnú senzibilizáciu (ako bolo stanovené v štúdiách *in vivo*) a rôzne fyzikálno-chemické vlastnosti (8) (9) (10) (19). Celkovo z týchto informácií vyplýva, že testovacia metóda DPRA je užitočná a môže prispieť k zisteniu nebezpečnosti kožnej senzibilizácie.

▼M7

Termín „testovaná chemikália“ sa v tejto testovacej metóde používa na označenie toho, čo sa testuje, a nesúvisí s použiteľnosťou DPRA na testovanie látok a/nebo zmesí. Túto testovaciu metódu nemožno použiť na testovanie zlúčenín kovov, keďže je o nich známe, že reagujú s proteínmi prostredníctvom mechanizmov iných než kovalentnou väzbou. Testovaná chemikália by mala byť rozpustná vo vhodnom rozpúšťadle pri konečnej koncentrácii 100 mM (pozri bod 18). Testované chemikálie, ktoré však nie sú rozpustné pri tejto koncentrácii, možno napriek tomu testovať pri nižších koncentráciách, pri ktorých sú rozpustné. V takom prípade by sa pozitívny výsledok mohol použiť na podporu identifikácie testovanej chemikálie ako kožný senzibilizátor, no z negatívneho výsledku by sa nemal vyvodzovať jednoznačný záver o nedostatočnej reaktivite. V súčasnosti sú dostupné len obmedzené informácie o použiteľnosti DPRA v prípade zmesí známeho zloženia (18) (19). Napriek tomu sa DPRA považuje za technicky použiteľnú v prípade testovania mnohozložkových látok a zmesí známeho zloženia (pozri bod 10). Pred použitím tejto testovacej metódy na zmesi s cieľom získať údaje na zamýšľaný regulačný účel by sa malo zvážiť, či na tento účel dokáže poskytnúť primerané výsledky, a ak dokáže, mali by sa zvážiť dôvody. Také úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi. V dôsledku vymedzeného molárneho pomeru testovanej chemikálie a peptidu nemožno súčasný prognostický model použiť v prípade komplexných zmesí s neznámym zložením alebo látok neznámeho alebo variabilného zloženia, produktov komplexných reakcií alebo biologických materiálov (t. j. látok UVCB). Na tento účel bude potrebné vyvinúť nový prognostický model založený na gravimetrii. V prípadoch, v ktorých možno predložiť dôkaz o nepoužiteľnosti testovacej metódy pri iných špecifických kategóriách chemikálií, by sa testovacia metóda nemala používať pri týchto špecifických kategóriách chemikálií.

Táto testovacia metóda je testovacia metóda in chemico, ktorá nezahŕňa metabolický systém. Pomocou tejto testovacej metódy nemožno zistiť chemikálie, ktoré na preukázanie svojho potenciálu vyvolať kožnú senzibilizáciu (pro-haptény) vyžadujú enzymatickú bioaktiváciu. Uvádza sa, že v niektorých prípadoch sú pomocou tejto testovacej metódy správne zistené chemikálie, ktoré sa stávajú senzibilizátormi po abiotickej transformácii (t. j. pre-haptény) (18). Vzhľadom na uvedenú skutočnosť by sa mali negatívne výsledky získané touto testovacou metódou interpretovať v kontexte stanovených obmedzení a spolu s ostatnými zdrojmi informácií v rámci IATA. V prípade testovaných chemikálií, ktoré sa neviažu kovalentne na peptid, ale podporujú jeho oxidáciu (t. j. dimerizácia cysteínu), by potenciálne mohlo dôjsť k príliš vysokému odhadu úbytku peptidov, čo môže viesť k falošným pozitívnym predpovediam a/alebo k zaradeniu do vyššej triedy reaktivity (pozri body 29 a 30).

Ako bolo opísané, DPRA pomáha rozlišovať kožné senzibilizátory od nesenzibilizujúcich chemikálií. Môže však takisto potenciálne prispieť k posúdeniu potenciálu spôsobiť senzibilizáciu (11), ak sa použije v rámci integrovaných prístupov ako IATA. Na to, aby bolo možné určiť, ako výsledky DPRA môžu prispieť k posudzovaniu potenciálu, však bude potrebná ďalšia práca, pokiaľ možno založená na údajoch o týkajúcich sa človeka.

PRINCÍP TESTU

DPRA je metóda in chemico, ktorá kvantifikuje zvyškovú koncentráciu peptidu obsahujúceho cysteín alebo lyzín po 24-hodinovej inkubácii s testovanou chemikáliou pri teplote 25 ± 2,5 °C. Syntetické peptidy obsahujú fenylalanín na uľahčenie detekcie. Relatívna koncentrácia peptidov sa meria pomocou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) s gradientovou elúciou a detekciou UV pri 220 nm. Následne sa vypočítajú percentuálne hodnoty úbytku cysteínových a lyzínových peptidov a použijú sa v prognostickom modeli (pozri bod 29), čo umožní zaradiť testovanú chemikáliu do jednej zo štyroch tried reaktivity, ktoré sa používajú na podporu rozlíšenia kožných senzibilizátorov od nesenzibilizujúcich chemikálií.

▼M7

Pred rutinným používaním metódy opísanej v tejto testovacej metóde by mali laboratóriá preukázať technickú spôsobilosť použitím látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2.

POSTUP

Táto testovacia metóda vychádza z protokolu DPRA DB-ALM č. 154 (20), ktorý sa používa pri validačnej štúdii koordinovanej EURL ECVAM. Tento protokol sa odporúča používať pri vykonávaní a používaní tejto metódy v laboratóriu. Ďalej je uvedený opis hlavných zložiek a postupov DPRA. Ak sa použije alternatívne nastavenie HPLC, mala by sa preukázať jeho rovnocennosť s validovaným nastavením opísaným v protokole DB-ALM (napr. testovaním látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2).

Príprava peptidov obsahujúcich cysteín alebo lyzín

Zásobné roztoky cysteínu (Ac-RFAACAA-COOH) a lyzínu (Ac-RFAAKAA-COOH) obsahujúce syntetické peptidy s čistotou vyššou než 85 % a pokiaľ možno v rozmedzí 90 – 95 % by sa mali pripravovať čerstvé bezprostredne pred ich inkubáciou s testovanou chemikáliou. Konečná koncentrácia cysteínových peptidov vo fosfátovom tlmivom roztoku s hodnotou pH 7,5 by mala byť 0,667 mM a konečná koncentrácia lyzínových peptidov v tlmivom roztoku octanu amónneho s hodnotou pH 10,2 by mala byť 0,667 mM. Rýchlosť úkonov HPLC by sa mala nastaviť tak, aby trvanie analýzy HPLC bolo kratšie než 30 hodín. Pri nastavení HPLC použitom vo validačnej štúdii a opísanom v tejto testovacej metóde možno pri jednom výkone HPLC spracovať až 26 analytických vzoriek (ktoré zahŕňajú testovanú chemikáliu, pozitívnu kontrolu a príslušný počet kontrol rozpúšťadla na základe počtu jednotlivých rozpúšťadiel použitých v teste, pričom každé z nich sa testuje trikrát). Pri všetkých replikátoch analyzovaných v rámci jedného testovania by sa mali použiť identické roztoky cysteínových a lyzínových peptidov. Odporúča sa, aby sa pri jednotlivých šaržiach peptidov pred ich použitím overila správna rozpustnosť.

Príprava testovanej chemikálie

Pred vykonaním skúšky by sa mala posúdiť rozpustnosť testovanej chemikálie vo vhodnom rozpúšťadle podľa postupu rozpúšťania popísaného v protokole DPRA DB-ALM (20). Vo vhodnom rozpúšťadle sa testovaná chemikália rozpustí úplne. Keďže pri DPRA sa testovaná chemikália inkubuje vo veľkom prebytku s cysteínovými alebo lyzínovými peptidmi, na potvrdenie toho, že sa testovaná chemikália (a v prípade testovania mnohozložkovej látky alebo zmesi všetky jej zložky) rozpustila, sa pokladá za postačujúce vykonať vizuálnu kontrolu tvorby číreho roztoku. Vhodnými rozpúšťadlami sú acetonitril, voda, zmes vody s acetonitrilom v pomere 1:1, izopropanol, acetón alebo zmes acetónu s acetonitrilom v pomere 1:1. Iné rozpúšťadlá možno použiť vtedy, ak nemajú vplyv na stabilitu peptidu sledovanú pomocou referenčných kontrol C (t. j. vzorky, ktoré tvorí len peptid rozpustený vo vhodnom rozpúšťadle; pozri dodatok 3). Poslednou možnosťou v prípade, že testovaná chemikália nie je rozpustná v žiadnom z uvedených rozpúšťadiel, je pokúsiť sa ju rozpustiť v 300 µl DMSO a výsledný roztok zriediť s 2 700 µl acetonitrilu, a pokiaľ testovaná chemikália nie je rozpustná v tejto zmesi, treba sa pokúsiť rozpúšťať to isté množstvo testovanej chemikálie v 1 500 µl DMSO a výsledný roztok zriediť s 1 500 µl acetonitrilu. Testovaná chemikália by sa mala vopred odvážiť do sklenených nádobiek a bezprostredne pred testovaním by sa mala rozpustiť vo vhodnom rozpúšťadle, aby sa získalo 10 mM roztoku. V prípade zmesí a viaczložkových látok známeho zloženia, by sa

▼M7

mala stanoviť jediná čistota ako súčet podielov jej zložiek (okrem vody) a jediná jasná molekulová hmotnosť na základe posúdenia jednotlivých molekulových hmotností každej zložky v zmesi (okrem vody) a ich jednotlivých podielov. Výsledná čistota a jasná molekulová hmotnosť by sa potom mali použiť na výpočet hmotnosti testovanej chemikálie, ktorá je potrebná na prípravu 100 mM roztoku. V prípade polymérov, pri ktorých nemožno stanoviť molekulovú hmotnosť hlavnej zložky, možno pri príprave 100 mM roztoku posúdiť molekulovú hmotnosť monoméru (alebo jasnú molekulovú hmotnosť rôznych momomérov tvoriacich polymér). Pri testovaní zmesí, mnohozložkových látok alebo polymérov známeho zloženia by sa však malo zvážiť aj testovanie chemikálie v čistom stave. V prípade kvapalín by sa chemikália v čistom stave mala testovať ako taká bez predchádzajúceho riedenia tak, že sa inkubuje s cysteínovými peptidmi v molárnom pomere 1:10 a lyzínovými peptidmi v molárnom pomere 1:50. V prípade tuhých látok by sa testovaná chemikália mala rozpustiť na svoju maximálnu rozpustnú koncentráciu v tom istom rozpúšťadle, ktoré bolo použité na prípravu roztoku so zdanlivou koncentráciou 100 mM. Následne by sa mala testovať bez ďalšieho riedenia tak, že sa inkubuje s cysteínovými peptidmi v molárnom pomere 1:10 a lyzínovými peptidmi v molárnom pomere 1:50. Na základe súhlasných výsledkov (reaktivita alebo nereaktivita) medzi roztokom so zdanlivou koncentráciou 100 mM a chemikáliou v čistom stave by sa mal dať vyvodiť spoľahlivý záver.

Príprava pozitívnej kontroly, referenčných kontrol a koelúcie na kontrolu

Cinamaldehyd (CAS číslo 104-55-2; ≥ 95 % potravinárska čistota) by sa mal použiť ako pozitívna kontrola (PC) pri koncentrácii 100 mM v acetonitrile. Možno použiť aj iné vhodné pozitívne kontroly, pokiaľ možno také, ktoré poskytujú hodnoty úbytku stredného rozsahu, ak sú k dispozícii historické údaje, z ktorých možno odvodiť porovnateľné kritériá prijateľnosti daného kola testovania. Do rýchlosti úkonov HPLC by sa navyše mali zaradiť referenčné kontroly (t. j. vzorky obsahujúce len peptidy rozpustené vo vhodnom rozpúšťadle), ktoré sa používajú na overenie vhodnosti systému HPLC pred analýzou (referenčné kontroly A), na overenie stability referenčných kontrol v priebehu času, (referenčné kontroly B) a na overenie toho, že rozpúšťadlo použité na rozpustenie testovanej chemikálie nebude mať vplyv na percentuálny úbytok peptidov (referenčné kontroly C) (pozri dodatok 3). Pri každej chemikálii sa použije vhodná referenčná kontrola na výpočet percentuálneho úbytku peptidov v prípade danej chemikálie (pozri bod 26). Okrem toho by sa do úkonov HPLC mala pri každej testovanej chemikálii, ktorá sa analyzuje, zaradiť koelúcia na kontrolu, ktorá pozostáva len z testovanej chemikálie, na detekciu prípadnej koelúcie testovanej chemikálie s lyzínovým alebo cysteínovým peptidom.

Inkubácia testovanej chemikálie s roztokmi cysteínových a lyzínových peptidov

Roztoky cysteínových a lyzínových peptidov by sa mali inkubovať v sklenených nádobkách na odber automatickým dávkovačom vzoriek s testovanou chemikáliou v pomere 1:10 pre cysteínové a 1:50 pre lyzínové peptidy. Ak sa hneď po pridaní roztoku testovanej chemikálie k roztoku peptidov spozoruje zrazenina v dôsledku jej nízkej rozpustnosti vo vode, nemožno mať v tomto prípade istotu, aké množstvo testovanej chemikálie zostalo v roztoku a bude môcť reagovať s peptidmi. Preto by sa v takom prípade mohol stále použiť pozitívny výsledok, ale negatívny výsledok je neistý a mal by sa interpretovať s náležitou opatrnosťou (pozri tiež ustanovenia bodu 11 o testovaní chemikálií nerozpustných až do koncentrácie 100 mM). Pred vykonaním analýzy HPLC by sa reakčný roztok mal nechať v tme pri teplote 25 ± 2,5 °C počas 24 ± 2 hodín. Každá testovaná chemikália by sa mala analyzovať trikrát v prípade oboch peptidov. Pred analýzou HPLC sa vzorky musia vizuálne skontrolovať. Ak sa zistí zrazenina alebo oddelenie fáz, možno vzorky odstrediť pri nízkej rýchlosti (100 – 400 x g), aby sa zrazenina z preventívnych dôvodov zatlačila ku dnu nádobky, keďže veľké množstvo zrazeniny môže zapchať trúbky alebo kolóny HPLC. Ak sa zrazenina alebo oddelenie fáz zistí po inkubačnej dobe, môže dôjsť k podhodnotenému odhadu úbytku peptidov a v prípade negatívneho výsledku nemožno s dostatočnou istotou vyvodiť záver o nedostatočnej reaktivite.

▼M7

Príprava štandardnej kalibračnej krivky pre HPLC

Mala by sa vytvoriť štandardná kalibračná krivka pre cysteínové, ako aj pre lyzínové peptidy. Štandardy peptidov by sa mali pripraviť v 20 % alebo 25 % roztoku acetonitril: tlmivý roztok s použitím fosfátového tlmivého roztoku (pH 7,5) pre cysteínové peptidy a tlmivého roztoku octanu amónneho (pH 10,2) pre lyzínové peptidy. S použitím štandardov sériového riedenia peptidového zásobného roztoku (0,667 mM) by sa malo pripraviť 6 kalibračných roztokov s rozsahom od 0,534 do 0,0167 mM. Do štandardnej kalibračnej krivky by sa mala zahrnúť aj slepá skúška s riediacim tlmivým roztokom. Vhodné kalibračné krivky by mali mať r^2>0,99.

Príprava a analýza HPLC

Pred vykonaním analýzy by sa mala overiť vhodnosť systému HPLC. Úbytok peptidov sa sleduje pomocou HPLC s pripojeným UV detektorom (detektorom s fotodiódovým poľom alebo absorpčným detektorom s fixnou vlnovou dĺžkou so signálom 220 nm). Do systému HPLC sa nainštaluje vhodná kolóna. Nastavenie HPLC opísané vo validačnej štúdii používa prednostne kolónu Zorbax SB-C-18 s rozmermi 2,1 mm × 100 mm × 3,5 mikrónu. S touto HPLC kolónou s reverznou fázou by mal byť celý systém v rovnovážnom stave pri teplote 30 °C s 50 % fázy A (0,1 obj. % kyseliny trifluóroctovej vo vode) a 50 % fázy B (0,085 obj. % kyseliny trifluóroctovej v acetonitrile) počas aspoň 2 hodín pred spustením. Analýza HPLC by sa mala vykonávať s použitím prietoku 0,35 ml/min a s lineárnym gradientom od 10 % do 25 % acetonitrilu počas 10 minút, s následným prudkým zvýšením na 90 % acetonitrilu s cieľom odstrániť ostatné materiály. Mali by sa injektovať rovnaké objemy každého štandardu, vzorky a kontroly. Kolóna by sa medzi vstreknutiami mala znovu nechať ustáliť pri pôvodných podmienkach počas 7 minút. Ak sa použije iná kolóna HPLC s reverznou fázou, možno bude potrebné upraviť opísané nastavenia parametrov, aby sa zabezpečilo primerané eluovanie a integrácia cysteínových a lyzínových peptidov vrátane injektovaného objemu, ktorý sa môže líšiť podľa použitého systému (zvyčajne v rozmedzí od 3 do 10 µl). Dôležité je, že ak sa použije alternatívne nastavenie HPLC, mala by sa preukázať jeho rovnocennosť s validovaným nastavením, ako sa opisuje vyššie (napr. testovaním látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2). Absorbancia sa meria pri 220 nm. Ak sa použije detektor s fotodiódovým poľom, mala by sa zaznamenávať aj absorbancia pri 258 nm. Je potrebné poznamenať, že niektoré dodávky acetonitrilu by mohli mať negatívny dosah na stabilitu peptidov, čo sa musí posúdiť pri používaní novej šarže acetonitrilu. Ako ukazovateľ koelúcie možno použiť pomer plochy píkov pri 220 nm k ploche píkov pri 258 nm. Pri každej vzorke by pomer v rozmedzí 90 % < priemernej hodnoty ([1]) pomeru plochy v prípade kontrolných vzoriek < 100 % bol dobrou indikáciou toho, že ku koelúcii nedošlo.

Môžu sa vyskytnúť testované chemikálie, ktoré by mohli podporovať oxidáciu cysteínových peptidov. Pík dimerizovaného cysteínového peptidu možno sledovať vizuálne. Ak sa zdá, že došlo k dimerizácii, malo by sa to zaznamenať, keďže percentuálny úbytok peptidov môže byť nadhodnotený a viesť tak k falošným pozitívnym predpovediam a/alebo k zaradeniu do vyššej triedy reaktivity (pozri body 29 a 30).

Analýzu cysteínových a lyzínových peptidov pomocou metódy HPLC možno vykonávať súbežne (ak sú k dispozícii dva systémy HPLC), alebo v dvoch rôznych dňoch. Ak sa analýza vykonáva v dvoch rôznych dňoch, potom by sa všetky roztoky testovaných chemikálií mali v každý z týchto dní pripraviť čerstvé

([1]) Priemerná hodnota v celom dokumente znamená aritmetický priemer.

▼M7

pre obe skúšky. Analýza by mala byť načasovaná tak, aby sa zaistilo, že vstreknutie prvej vzorky začne 22 až 26 hodín po tom, ako bola testovaná chemikália zmiešaná s roztokom peptidov. Rýchlosť úkonov HPLC by sa mala nastaviť tak, aby trvanie analýzy HPLC bolo kratšie než 30 hodín. Pri nastavení HPLC použitom vo validačnej štúdii a opísanom v tejto testovacej metóde možno pri jednom výkone HPLC spracovať až 26 analytických vzoriek (pozri aj bod 17). Príklad sekvencie analýzy HPLC je uvedený v dodatku 3.

PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Vyhodnotenie údajov

Koncentrácia cysteínových alebo lyzínových peptidov sa v každej vzorke stanovuje fotometricky pri 220 nm zmeraním plochy píku (plocha pod krivkou) vhodných píkov a výpočtom koncentrácie peptidov pomocou lineárnej kalibračnej krivky odvodenej zo štandardov.

Percentuálny úbytok peptidov sa stanovuje v každej vzorke meraním plochy píku, ktorá sa vydelí priemernou hodnotou plochy píku príslušných referenčných kontrol C (pozri dodatok 3) podľa tohto vzorca.

$$\textit{Percentuálny úbytok peptidov} = \left[1 - \left(\frac{\textit{plocha píku peptidov vinjektovaných replikátoch}}{\textit{priemerná hodnota plochy píku vref . kontrolách C}}\right)\right] \times 100$$

Kritériá prijateľnosti

Aby sa výkon pokladal za platný, mali by byť splnené tieto kritériá:

a) štandardná kalibračná krivka by mala mať $r^2 > 0{,}99$.

b) priemerná hodnota percentuálneho úbytku peptidov v prípade troch replikátov na pozitívnu kontrolu s cinamaldehydom by mala byť pri cysteínovom peptide od 60,8 % do 100 % a pri lyzínovom peptide od 40,2 % do 69,0 % a maximálna štandardná odchýlka (SD) pri replikátoch na pozitívnu kontrolu by mala byť < 14,9 % pre percentuálny úbytok cysteínových peptidov a < 11,6 % pre percentuálny úbytok lyzínových peptidov a

c) priemerná hodnota koncentrácie peptidov z referenčných kontrol A by mala byť 0,50 ± 0,05 mM a variačný koeficient (CV) plôch píkov u peptidov pre deväť referenčných kontrol B a C v acetonitrile by mal byť < 15,0 %.

Ak nie je splnené jedno alebo viacero kritérií, mal by sa postup zopakovať.

Aby sa výsledky s testovanou chemikáliou pokladali za platné, mali by byť splnené tieto kritériá:

a) maximálna štandardná odchýlka v prípade replikátov s testovanou chemikáliou by mala byť pre percentuálny úbytok cysteínu < 14,9 % a pre percentuálny úbytok lyzínu < 11,6 %.

b) priemerná hodnota koncentrácie peptidov troch referenčných kontrol C vo vhodnom rozpúšťadle by mala byť 0,50 ± 0,05 mM. Ak tieto kritériá nie sú splnené, údaje by sa mali zamietnuť a postup by sa mal s touto konkrétnou chemikáliou zopakovať.

Prognostický model

Pre každú testovanú chemikáliu sa vypočíta priemerná hodnota percentuálneho úbytku cysteínu a percentuálneho úbytku lyzínu. Záporný úbytok sa pri výpočte priemernej hodnoty považuje za „0“. Pri použití prognostického modelu cysteín 1:10/lyzín 1:50, ako sa uvádza v tabuľke 1, by sa prahová hodnota 6,38 % priemerného úbytku peptidov mala použiť na podporu rozlíšenia kožných senzibilizátorov od nesenzibilizujúcich chemikálií v rámci IATA. Uplatnenie tohto prognostického modelu pri zaraďovaní testovanej chemikálie do príslušnej triedy reaktivity (t. j. nízka, mierna, vysoká reaktivita) by sa mohlo osvedčiť ako užitočné z hľadiska informácií pre posúdenie potenciálu v rámci IATA.

▼M7

Tabuľka 1

Prognostický model cysteín 1:10/lyzín 1:50 ([1])

Priemerná hodnota úbytku cysteínu a lyzínu	Trieda reaktivity	Predpoklad DPRA ([2])
0 % ≤ priemerná hodnota percentuálneho úbytku ≤ 6,38 %	žiadna alebo minimálna reaktivita	negatívna
6,38 % < priemerná hodnota percentuálneho úbytku ≤ 22,62 %	nízka reaktivita	pozitívna
22,62 % < priemerná hodnota percentuálneho úbytku ≤ 42,47 %	mierna reaktivita	
42,47 % < priemerná hodnota percentuálneho úbytku ≤ 100 %	vysoká reaktivita	

([1]) Tieto číselné údaje sa vzťahujú na štatisticky vygenerované prahové hodnoty a nesúvisia s presnosťou merania.
([2]) Predpoklad DPRA by sa mal zvážiť v rámci IATA a v súlade s ustanoveniami bodov 9 a 12.

Môže sa stať, že testovaná chemikália (látka alebo jedna alebo viacero zložiek mnohozložkovej látky alebo zmesi) pri 220 nm výrazne absorbuje a má ten istý retenčný čas ako peptid (koelúcia). Koelúciu možno vyriešiť miernou úpravou nastavenia HPLC, aby sa viac oddelil elučný čas testovanej chemikálie a peptidu. Ak sa použije alternatívne nastavenie HPLC v snahe vyriešiť koelúciu, mala by sa preukázať jeho rovnocennosť s validovaným nastavením (napr. testovaním látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2). Ak nastane koelúcia, pík peptidu nemožno integrovať a výpočet percentuálneho úbytku peptidu nie je možný. Ak dôjde ku koelúcii takýchto testovaných chemikálií s cysteínovými, ako aj lyzínovými peptidmi, mala by sa analýza označiť za analýzu „bez výsledku“. V prípadoch, kedy dochádza ku koelúcii len s lyzínovým peptidom, možno použiť prognostický model cysteín 1:10 uvedený v tabuľke 2.

Tabuľka 2

Prognostický model cysteín 1:10 ([1])

Percentuálny úbytok cysteínu (Cys) %	Trieda reaktivity	Predpoklad DPRA ([2])
0 % ≤ percentuálny úbytok Cys ≤ 13,89 %	žiadna alebo minimálna reaktivita	negatívna
13,89 % < percentuálny úbytok Cys ≤ 23,09 %	nízka reaktivita	pozitívna
23,09 % < percentuálny úbytok Cys ≤ 98,24 %	mierna reaktivita	
98,24 % < percentuálny úbytok Cys ≤ 100 %	vysoká reaktivita	

([1]) Tieto číselné údaje sa vzťahujú na štatisticky vygenerované prahové hodnoty a nesúvisia s presnosťou merania.
([2]) Predpoklad DPRA by sa mal zvážiť v rámci IATA a v súlade s ustanoveniami bodov 9 a 12.

Mohlo by dôjsť k iným prípadom, v ktorých prekrývanie retenčného času medzi testovanou chemikáliou a niektorým z peptidov nie je úplné. V takýchto prípadoch možno percentuálne hodnoty úbytku peptidov odhadnúť a použiť ich v prognostickom modeli cysteín 1:10/lyzín 1:50, no zaradenie testovanej chemikálie do triedy reaktivity nemožno vykonať presne.

▼M7

Jediná analýza HPLC pre cysteínové aj lyzínové peptidy by mala byť pre testovanú chemikáliu postačujúca, ak výsledok nie je jednoznačný. Avšak v prípadoch, keď sa výsledky približujú prahovej hodnote používanej na rozlíšenie medzi pozitívnymi a negatívnymi výsledkami (t. j. hraničné výsledky), môže byť potrebné ďalšie testovanie. Ak sa priemerná hodnota percentuálneho úbytku nachádza v rozpätí od 3 % do 10 % v prípade prognostického modelu pre cysteín 1:10/lyzín 1:50, alebo ak sa percentuálny úbytok cysteínu nachádza v rozmedzí od 9 % do 17 % v prípade prognostického modelu pre cysteín 1:10, malo by sa zvážiť vykonanie druhej analýzy a v prípade nesúhlasných výsledkov medzi prvými dvomi analýzami aj vykonanie tretej analýzy.

Skúšobný protokol

Skúšobný protokol by mal obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— Jednozložková látka

  — identifikácia chemikálie, ako je názov(-vy) IUPAC alebo CAS, číslo(-a) CAS, kód SMILES alebo InChI, štrukturálny vzorec a/alebo iné identifikátory,

  — fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode, molekulová hmotnosť a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu,

  — čistota, chemická identita nečistôt, ak je to potrebné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

  — prípadná úprava pred testovaním (napr. zahrievanie, drvenie),

  — testovaná(-é) koncentrácia(-e),

  — podmienky skladovania a stability v dostupnom rozsahu.

— Mnohozložková látka, UVCB a zmes:

  — charakterizovaná pokiaľ možno napr. chemickou identitou (pozri vyššie), čistotou, kvantitatívnym výskytom a relevantnými fyzikálno-chemickými vlastnosťami (pozri vyššie) zložiek, v dostupnom rozsahu,

  — fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu,

  — molekulová hmotnosť alebo jasná molekulová hmotnosť v prípade zmesí/polymérov známeho zloženia alebo iné informácie relevantné na vykonanie štúdie,

  — prípadná úprava pred testovaním (napr. zahrievanie, drvenie),

  — testovaná(-é) koncentrácia(-e),

  — podmienky skladovania a stability v dostupnom rozsahu.

Kontroly

— Pozitívna kontrola

  — identifikácia chemikálie, ako je názov(-vy) IUPAC alebo CAS, CAS číslo(-a), kód SMILES alebo InChI, štrukturálny vzorec a/alebo iné identifikátory,

  — fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode, molekulová hmotnosť a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu;

  — čistota, chemická identita nečistôt, ak je to potrebné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

▼M7

— prípadná úprava pred testovaním (napr. zahrievanie, drvenie),

— testovaná(-é) koncentrácia(-e),

— podmienky skladovania a stability v dostupnom rozsahu,

— odkaz na prípadné historické výsledky pozitívnych kontrol preukazujúcich vhodnosť kritérií prijateľnosti vykonania.

— Rozpúšťadlo/nosič

— použité rozpúšťadlo/použitý nosič a prípadne pomer ich zložiek,

— identifikácia(-e) chemikálie, ako je názov(-vy) IUPAC alebo CAS, CAS číslo(-a) a/alebo iné identifikátory,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak je to potrebné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— fyzický vzhľad, molekulová hmotnosť a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v prípade iných rozpúšťadiel/nosičov, než sú použité rozpúšťadlá/nosiče uvedené v testovacej metóde, v dostupnom rozsahu;

— podmienky skladovania a stability v dostupnom rozsahu,

— zdôvodnenie výberu rozpúšťadla pre každú chemikáliu,

— v prípade acetonitrilu výsledky testu dosahu na stabilitu peptidov.

Príprava peptidov, pozitívnej kontroly a testovanej chemikálie

— charakteristika roztokov peptidov (dodávateľ, šarža, presná hmotnosť peptidu, objem pridaný pre zásobný roztok),

— charakteristika roztoku pozitívnej kontroly (presná hmotnosť látky na pozitívnu kontrolu, objem pridaný pre testovací roztok),

— charakteristika roztokov testovanej chemikálie (presná hmotnosť testovanej chemikálie, objem pridaný do testovacieho roztoku).

Nastavenie prístroja HPLC a analýza HPLC

— typ prístroja HPLC, HPLC a predkolóny, detektor, automatický dávkovač vzoriek,

— parametre relevantné pre analýzu HPLC, ako je teplota kolóny, vstrekovacie/vstreknuté objemy, prietok a gradient.

Vhodnosť systému

— plocha píku peptidov pri 220 nm každého štandardu a replikátu na referenčnú kontrolu A,

— lineárna kalibračná krivka vyjadrená graficky a uvedená hodnota r^2,

— koncentrácia peptidu každého replikátu na referenčnú kontrolu A,

— priemerná hodnota koncentrácie peptidov (mM) troch referenčných kontrol A, SD a CV,

— koncentrácia peptidov referenčných kontrol A a C.

▼M7

Postup analýzy

— Pri referenčných kontrolách:

  — plocha píku peptidov pri 220 nm každého replikátu B a C,

  — priemerná hodnota plochy píku pri 220 nm deviatich referenčných kontrol B a C v acetonitrile, SD a CV (pre stabilitu referenčných kontrol počas analýzy),

  — v prípade každého použitého rozpúšťadla priemerná hodnota plochy píku peptidov pri 220 nm troch vhodných referenčných kontrol C (na výpočet percentuálneho úbytku peptidov),

  — v prípade každého použitého rozpúšťadla hodnota koncentrácie peptidov (mM) troch vhodných referenčných kontrol C,

  — v prípade každého použitého rozpúšťadla priemerná hodnota koncentrácie peptidov (mM) troch vhodných referenčných kontrol C, SD a CV.

— Pri pozitívnej kontrole:

  — plocha píku peptidov pri 220 nm každého replikátu,

  — percentuálny úbytok peptidov každého replikátu,

  — priemerná hodnota percentuálneho úbytku peptidov troch replikátov, SD a CV.

— Pri každej chemikálii:

  — vzhľad zrazeniny v reakčnej zmesi (ak sa spozoruje) na konci inkubačnej doby, informácia o tom, či bola zrazenina opäť rozpustená alebo odstredená,

  — prítomnosť koelúcie,

  — prípadne opis akýchkoľvek relevantných zistení,

  — plocha píku peptidov pri 220 nm každého replikátu,

  — percentuálny úbytok peptidov každého replikátu,

  — priemerná hodnota percentuálneho úbytku peptidov troch replikátov, SD a CV,

  — priemerná hodnota percentuálnych úbytkov lyzínu a cysteínu,

  — použitý prognostický model a predpoklad DPRA.

Testovanie spôsobilosti

— V uplatniteľnom prípade použitý postup na preukázanie spôsobilosti laboratória vykonávať testovaciu metódu (napr. testovaním látok na preukázanie spôsobilosti) alebo na preukázanie opakovateľného vykonávania testovacej metódy v priebehu času.

Diskusia o výsledkoch

— Diskusia o výsledkoch získaných testovacou metódou DPRA,

— diskusia o výsledkoch testovacej metódy v kontexte IATA, ak sú k dispozícii iné relevantné informácie.

Záver

▼M7

LITERATÚRA

1. United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Dostupné na: 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. Chapter B.6 of this Annex: Skin Sensitisation.

4. Chapter B.42 of this Annex: The Local Lymph Node Assay

5. Chapter B.50 of this Annex: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay: DA.

6. Chaper B.51 of this Annex: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay 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. Dostupné na: 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. Dostupné na: 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. Dostupné na: 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. Dostupné na: 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

Dodatok 1

DEFINÍCIE

Presnosť: miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Týka sa výkonnosti testovacej metódy a jedného z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (21).

AOP (dráha nepriaznivého účinku): sled udalostí počnúc chemickou štruktúrou cieľovej chemikálie alebo skupiny podobných chemikálií vyvolaných molekulárnou iniciáciou až po výsledok *in vivo* (2), ktorý je predmetom záujmu.

Kalibračná krivka: vzťah medzi experimentálnou hodnotou reakcie a analytickou koncentráciou (nazývaný aj ako *štandardná krivka*) známej látky.

Chemikália: látka alebo zmes.

Variačný koeficient: týka sa variability, ktorá sa v prípade skupiny údajov z replikátov vypočítava vydelením štandardnej odchýlky od priemeru. Môže sa vynásobiť faktorom 100 a vyjadriť v percentách.

Nebezpečenstvo (ohrozenie): inherentná vlastnosť činidla, prípadne situácia, ktorá môže vyvolať nepriaznivé účinky pri expozícii organizmu, systému alebo (sub)populácie účinkom daného činidla.

IATA (integrovaný prístup k testovaniu a hodnoteniu): štruktúrovaný prístup používaný na identifikáciu (potenciálneho) nebezpečenstva, charakterizáciu nebezpečenstva (z hľadiska potencie) a/alebo hodnotenie bezpečnosti (potenciál/potencia a expozícia) chemikálie alebo skupiny chemikálií, ktorý strategicky integruje a porovnáva všetky relevantné údaje s cieľom informovať regulačný orgán o potenciálnom nebezpečenstve a/alebo riziku a/alebo potrebe vykonania ďalších cielených, t. j. minimálnych testov.

Molekulárna iniciácia: chemicky vyvolané narušenie biologického systému na úrovni molekúl, ktoré sa považuje za začiatok AOP.

Zmes: zmes alebo roztok zložený z dvoch alebo viacerých látok, ktoré spolu nereagujú (1).

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej do 80 hm. %.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii ≥ 10 hm. % a < 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi

▼M7

zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo k chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

Pozitívna kontrola: replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému a ovplyvnený látkou, o ktorej je známe, že vyvolá pozitívnu reakciu. Aby bolo možné vyhodnotiť premenlivosť reakcie na pozitívnu kontrolu v čase, veľkosť pozitívnej reakcie by nemala byť extrémne silná.

Referenčná kontrola: neovplyvnená vzorka, ktorá obsahuje všetky zložky testovacieho systému, vrátane rozpúšťadla alebo nosiča, ktorá sa spracuje použitím ovplyvnenej testovanej chemikálie a inými kontrolami, aby sa zistila základná reakcia vzoriek upravených testovanou chemikáliou rozpustenou v tom istom rozpúšťadle alebo nosiči. Keď sa táto vzorka testuje so súbežnou negatívnou kontrolou, preukáže sa aj to, či rozpúšťadlo alebo nosič interagujú s testovacím systémom.

Relevantnosť: opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a zmysluplnosti a užitočnosti testu na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej test správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testovacej metódy (21).

Spoľahlivosť: meria rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Hodnotí sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a vnútrolaboratórnej opakovateľnosti (21).

Reprodukovateľnosť: zhoda výsledkov získaných testovaním tej istej chemikálie s použitím toho istého skúšobného protokolu (pozri spoľahlivosť) (21).

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií správne klasifikovaných testovacou metódou. Ide o presnosť testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky a musí sa zohľadniť pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (21).

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií správne klasifikovaných testovacou metódou. Ide o presnosť testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky a musí sa zohľadniť pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (21).

Látka: chemické prvky a ich zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané pomocou akéhokoľvek výrobného procesu, vrátane všetkých prísad potrebných na uchovanie stability výrobku a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, no s vylúčením všetkých rozpúšťadiel, ktoré je možné oddeliť bez toho, aby ovplyvnili stabilitu látky alebo zmenili jej zloženie (1).

Vhodnosť systému: stanovenie prístrojových parametrov (napr. citlivosti) analýzou referenčného štandardu pred spustením analytickej dávky (22).

Testovaná chemikália: pojem „testovaná chemikália“ sa používa ako odkaz na to, čo sa testuje.

Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií OSN (ďalej len „GHS OSN“): systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a miery fyzického, zdravotného a environmentálneho nebezpečenstva a označovania pomocou príslušných komunikačných prvkov, ako sú piktogramy, signalizačné výrazy, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, ktoré obsahujú informácie o ich škodlivých účinkoch z hľadiska ochrany ľudí (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a záchranných zložiek) a životného prostredia (1).

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

Platná testovacia metóda: testovacia metóda, ktorá sa na daný účel považuje za dostatočne relevantnú a spoľahlivú a ktorá je založená na vedecky podložených zásadách. Testovacia metóda nie je nikdy platná v absolútnom zmysle, ale len vo vzťahu k vymedzenému účelu (21).

▼M7

Dodatok 2

CHEMIKÁLIE NA PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

Kožná senzibilizácia *in chemico*: skúška priamej peptidovej reaktivity

Pred rutinným použitím tejto testovacej metódy by mali laboratóriá preukázať technickú spôsobilosť tým, že správne získajú očakávanú prognózu výsledku skúšky priamej peptidovej reaktivity (DPRA) v prípade 10 chemikálií na preukázanie spôsobilosti odporúčaných v tabuľke 1, a získaním hodnôt úbytku cysteínu a lyzínu, ktoré spadajú do príslušného referenčného rozsahu pre 8 z 10 látok na preukázanie spôsobilosti pri každom peptide. Tieto látky na preukázanie spôsobilosti boli vybrané tak, aby reprezentovali rozpätie reakcií na nebezpečenstvo kožnej senzibilizácie. Medzi ďalšie kritériá výberu patrí ich komerčná dostupnosť, dostupnosť kvalitných referenčných údajov *in vivo* a údajov *in vitro* získaných z DPRA, ako aj skutočnosť, že boli použité vo validačnej štúdii koordinovanej referenčným laboratóriom Európskej únie pre alternatívy testovania na zvieratách (EURL ECVAM) na preukázanie úspešného zavedenia testovacej metódy laboratóriami zapojenými do štúdie.

Tabuľka 1

Odporúčané chemikálie na preukázanie technickej spôsobilosti pri skúške priamej peptidovej reaktivity (DPRA)

Chemikálie na preukázanie spôsobilosti	CAS č.	Fyzikálny stav	Prognóza *in vivo* [1]	Prognóza DPRA [2]	Rozsah [3] úbytku peptidu cysteín (v %)	Rozsah [3] úbytku peptidu lyzín (v %)
2,4-dinitrochlórbenzén	97-00-7	v tuhej forme	senzibilizátor (extrémny)	pozitívna	90 – 100	15 – 45
oxazolón	15646-46-5	v tuhej forme	senzibilizátor (extrémny)	pozitívna	60 – 80	10 – 55
formaldehyd	50-00-0	v kvapalnej forme	senzibilizátor (silný)	pozitívna	30 – 60	0 – 24
benzylidénacetón	122-57-6	v tuhej forme	senzibilizátor (mierny)	pozitívna	80 – 100	0 – 7
farnesal	19317-11-4	v kvapalnej forme	senzibilizátor (slabý)	pozitívna	15 – 55	0 – 25
2,3-butándión	431-03-8	v kvapalnej forme	senzibilizátor (slabý)	pozitívna	60 – 100	10 – 45
bután-1-ol	71-36-3	v kvapalnej forme	nespôsobuje senzibilizáciu	negatívna	0 – 7	0 – 5,5
6-metylkumarín	92-48-8	v tuhej forme	nespôsobuje senzibilizáciu	negatívna	0 – 7	0 – 5,5
kyselina mliečna	50-21-5	v kvapalnej forme	nespôsobuje senzibilizáciu	negatívna	0 – 7	0 – 5,5
1-(4-metoxyfenyl)etán-1-ón	100-06-1	v tuhej forme	nespôsobuje senzibilizáciu	negatívna	0 – 7	0 – 5,5

([1]) Prognózy nebezpečnosti a (potencie) *in vivo* vychádzajú z údajov LLNA (19). Potencia *in vivo* je odvodená pomocou kritérií navrhnutých ECETOC (23).

([2]) Prognóza DPRA by sa mala zvážiť v rámci IATA a v súlade s ustanoveniami bodov 9 a 11.

([3]) Rozsahy určené na základe minimálne 10 hodnôt úbytku vytvorených 6 nezávislými laboratóriami.

▼M7

Dodatok 3

PRÍKLADY SEKVENČNEJ ANALÝZY

Kalibračné štandardy a referenčné kontroly	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 tlmivý roztok referenčná kontrola A, replikát 1 referenčná kontrola A, replikát 2 referenčná kontrola A, replikát 3
Kontroly koelúcie	kontrola koelúcie 1 v prípade testovanej chemikálie 1 kontrola koelúcie 2 v prípade testovanej chemikálie 2
Referenčné kontroly	referenčná kontrola B, replikát 1 referenčná kontrola B, replikát 2 referenčná kontrola B, replikát 3
Prvý súbor replikátov	referenčná kontrola C, replikát 1 aldehyd kyseliny škoricovej, replikát 1 vzorka 1, replikát 1 vzorka 2, replikát 1
Druhý súbor replikátov	referenčná kontrola C, replikát 2 aldehyd kyseliny škoricovej, replikát 2 vzorka 1, replikát 2 vzorka 2, replikát 2
Tretí súbor replikátov	referenčná kontrola C, replikát 3 aldehyd kyseliny škoricovej, replikát 3 vzorka 1, replikát 3 vzorka 2, replikát 3
Referenčné kontroly	referenčná kontrola B, replikát 4 referenčná kontrola B, replikát 5 referenčná kontrola B, replikát 6

Súčasťou sekvenčnej analýzy by mali byť tieto tri súbory referenčných kontrol (t. j. vzoriek zložených iba z peptidu rozpusteného vo vhodnom rozpúšťadle):
Referenčná kontrola A: používa sa na overenie vhodnosti systému vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC).
Referenčná kontrola B: zaradené na začiatok a koniec sekvenčnej analýzy na overenie stability referenčných kontrol v priebehu analýzy.
Referenčná kontrola C: ako súčasť sekvenčnej analýzy, ktorou sa overí, či rozpúšťadlo použité na rozpustenie testovanej chemikálie neovplyvňuje percento úbytku peptidu.

▼M7

B.60. **KOŽNÁ SENZIBILIZÁCIA *IN VITRO*: TESTOVACIA METÓDA „ARE-NRF2 LUCIFERÁZA“**

ÚVOD

Táto testovacia metóda (TM) zodpovedá usmerneniu OECD na vykonávanie testov (TG) 442D (2015). Pod kožným senzibilizátorom sa rozumie látka, ktorá pri kontakte s pokožkou vyvolá alergickú reakciu podľa definície v Globálnom harmonizovanom systéme klasifikácie a označovania chemických látok (GHS OSN) (1) a nariadení Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (CLP) ([1]). Táto testovacia metóda je postupom *in vitro* (analýza ARE-Nrf2 luciferáza) používaným ako pomoc pri rozlišovaní medzi kožnými senzibilizátormi a látkami, ktoré senzibilizáciu nespôsobujú, v súlade s GHS OSN (1) a CLP.

V prípade kľúčových biologických udalostí vedúcich ku kožnej senzibilizácii panuje všeobecná zhoda. Súčasné poznatky o chemických a biologických mechanizmoch súvisiacich s kožnou senzibilizáciou boli zhrnuté ako dráha nepriaznivého účinku (*adverse outcome pathway* – AOP) (2), počnúc molekulárnou iniciáciou cez parciálne udalosti až k nepriaznivému alergickému účinku, t. j. alergickej kontaktnej dermatitíde u ľudí alebo kontaktnej hypersenzitivite u hlodavcov (2) (3). Molekulárna iniciácia znamená kovalentnú väzbu elektrofilných látok s nukleofilnými jadrami kožných proteínov. K druhej kľúčovej udalosti v rámci tejto AOP dochádza v keratínocytoch, pričom zahŕňa zápalové reakcie, ako aj génovú expresiu v súvislosti so špecifickými signálnymi dráhami bunky, akými sú dráhy závislé od sekvencie ARE (*antioxidant/electrophile response element*). Treťou kľúčovou udalosťou je aktivácia dendritických buniek, ktorá sa zvyčajne posudzuje podľa prejavov špecifických povrchových bunkových markerov, chemokínov a cytokínov. Štvrtou kľúčovou udalosťou je proliferácia T-buniek, ktorá sa nepriamo posudzuje lokálnou skúškou lymfatických uzlín (4) na myšiach a potkanoch.

Posudzovanie kožnej senzibilizácie obyčajne zahŕňalo použitie laboratórnych zvierat. Tradičné metódy založené na morčatách, t. j. Magnusson Kligmanov test na morčatách (GPMT) a Buehlerov test [TM B. 6 (5)], sledovali tak indukčnú, ako aj elicitačnú fázu kožnej senzibilizácie. Uznanie si získala aj lokálna skúška lymfatických uzlín (LLNA) [TM B. 42 (4)] u myší a potkanov a jej dve nerádioaktívne modifikácie LLNA: DA [TM B.50 (6)] a LLNA: BrdU-ELISA [TM B.51 (7)], ktorými sa posudzuje výlučne indukčná odozva, pretože sú vhodnejšie ako testy na morčatách tak z hľadiska dobrých životných podmienok zvierat, ako aj objektívneho merania indukčnej fázy kožnej senzibilizácie.

Nedávno boli vedecky overené testovacie metódy *in chemico* a *in vitro* založené na mechanistických poznatkoch, ktorými sa posudzuje nebezpečnosť chemikálií z hľadiska kožnej senzibilizácie. Aby sa však dali plne nahradiť v súčasnosti používané testy na zvieratách, bude potrebné kombinovať metódy testovania bez použitia zvierat (*in silico, in chemico, in vitro*) v rámci integrovaných prístupov k testovaniu a hodnoteniu (IATA), vzhľadom na obmedzené mechanistické pokrytie AOP jednotlivých v súčasnosti dostupných metód testovania bez použitia zvierat (2) (3).

Navrhuje sa, aby sa táto testovacia metóda (analýza ARE-Nrf2 luciferáza) používala v prípade druhej kľúčovej udalosti podľa bodu 2. Existujú informácie o tom, že kožné senzibilizátory indukujú gény regulované sekvenciou ARE (8) (9). Malé elektrofilné látky ako kožné senzibilizátory môžu vystupovať ako senzorový

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006 (Ú. v. EÚ L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼M7

proteín Keap1(*Kelch-like ECH-associated protein 1*), napr. kovalentnou modifikáciou jeho cysteínového rezídua, ktorá povedie k jeho oddeleniu od transkripčného faktoru Nrf2 (*nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*). Oddelený Nrf2 potom môže aktivovať ARE-dependentné gény, ako sú tie, ktoré kódujú detoxifikačné enzýmy druhej fázy (8) (10) (11).

V súčasnosti je jedinou takouto testovacou metódou, ktorá zahŕňa skúšku ARE-Nrf2 luciferáza, skúška KeratinoSens™, v prípade ktorej boli dokončené validačné štúdie (9) (12) (13) a následne vykonané nezávislé partnerské preskúmanie referenčným laboratóriom Európskej únie pre alternatívy testovania na zvieratách (EURL ECVAM) (14). KeratinoSens™ bola považovaná za vedecky platnú skúšku, ktorá sa má na účely klasifikácie nebezpečnosti a označovania (14) používať ako súčasť IATA ako pomoc pri rozlišovaní medzi kožnými senzibilizátormi a látkami, ktoré senzibilizáciu nespôsobujú. Laboratóriá ochotné zaviesť túto testovaciu metódu môžu získať rekombinovanú bunkovú líniu používanú pri skúške KeratinoSens™ uzavretím licenčnej zmluvy so spoločnosťou, ktorá túto testovaciu metódu vyvinula (15).

Definície sú uvedené v dodatku 1.

ÚVODNÉ ÚVAHY, POUŽITEĽNOSŤ A OBMEDZENIA

Keďže aktivácia dráhy Keap1-Nrf 2-ARE sa zaoberá len druhou kľúčovou udalosťou v rámci AOP pri kožnej senzibilizácii, informácie z testovacích metód založených na aktivácii tejto dráhy pravdepodobne nebudú stačiť v prípade, že sa na zistenie potenciálu chemikálií spôsobovať kožnú senzibilizáciu použijú samostatne. Preto by sa údaje získané pomocou tejto testovacej metódy mali zvažovať v kontexte integrovaných prístupov, ako napríklad IATA a kombinovať s inými doplňujúcimi informáciami. napr. odvodenými zo skúšok *in vitro* zameraných na iné kľúčové udalosti v rámci AOP pri kožnej senzibilizácii, ako aj z metód bez testov vrátane údajov prevzatých z chemických analógov. Príklady použitia testovacej metódy „ARE-Nrf2 luciferáza“ v kombinácii s ďalšími informáciami sú uvedené v literatúre (13) (16) (17) (18) (19).

Táto testovacia metóda sa môže použiť ako pomoc pri rozlišovaní medzi kožnými senzibilizátormi (t. j. kategória 1 GHS OSN/CLP) a látkami, ktoré senzibilizáciu nespôsobujú, v kontexte IATA. Táto testovacia metóda sa nemôže používať samostatne, ani na ďalšiu kategorizáciu kožných senzibilizátorov do podkategórií 1A a 1B podľa GHS OSN/CLP či na predpovedanie potencie pri prijímaní rozhodnutí v rámci posudzovania bezpečnosti. V závislosti od regulačného rámca sa však pozitívny výsledok môže používať samostatne pri klasifikácii chemikálie do kategórie 1 GHS OSN/CLP.

Na základe súboru údajov z validačnej štúdie a interného testovania použitého na nezávislé partnerské preskúmanie testovacej metódy sa preukázalo, že skúška KeratinoSens™ sa dá preniesť aj do laboratórií, ktoré majú skúsenosti s bunkovými kultúrami. Miera reprodukovateľnosti v prognózach, ktorú možno od tejto testovacej metódy očakávať, je rádovo 85 % v rámci laboratória a medzi laboratóriami (14). Zvážením všetkých údajov, ktoré boli laboratóriu EURL ECVAM predložené na hodnotenie, ako aj výsledkov partnerského preskúmania tejto testovacej metódy, sa vypočítala presnosť (77 % – 155/201), citlivosť (78 % – 71/91) a špecifickosť (76 % – 84/110) skúšky KeratinoSens™ na účely rozlišovania medzi kožnými senzibilizátormi (t. j. kategóriou 1 GHS OSN/CLP) a látkami, ktoré senzibilizáciu nespôsobujú, v porovnaní s výsledkami LLNA. Tieto čísla sú

▼M7

podobné tým, ktoré boli nedávno uverejnené na základe interného testovania približne 145 látok (s presnosťou 77 %, citlivosťou 79 % a špecifickosťou 72 %) (13). Skúška KeratinoSens™ má tendenciu podhodnocovať prognózy v prípade chemikálií s nízkou až miernou potenciou kožnej senzibilizácie (t. j. podkategória 1B GHS OSN/CLP) v porovnaní s chemikáliami s vysokou potenciou kožnej senzibilizácie (t. j. podkategória 1A GHS OSN/CLP) (13) (14). V konečnom dôsledku z týchto informácií vyplýva užitočnosť skúšky KeratinoSens™ pri identifikácii nebezpečenstva kožnej senzibilizácie. Hodnoty presnosti, ktoré sa tu uvádzajú v prípade skúšky KeratinoSens™ ako samostatnej testovacej metódy, sú len orientačné, keďže táto testovacia metóda by sa mala posudzovať v spojení s inými zdrojmi informácií v rámci IATA a v súlade s ustanoveniami bodu 9 uvedeného vyššie. Okrem toho by sa pri hodnotení metód testovania kožnej senzibilizácie bez použitia zvierat nemalo zabúdať na skutočnosť, že LLNA, ako aj iné testy na zvieratách, nemusia úplne odrážať situáciu pri druhoch, ktoré sú predmetom záujmu, t. j. u ľudí.

Pojem „testovaná chemikália“ sa v tejto testovacej metóde používa ako odkaz na to, čo sa testuje, a netýka sa použiteľnosti testovacej metódy „ARE-Nrf2 luciferáza“ na testovanie látok a/alebo zmesí. Na základe súčasných dostupných údajov sa ukázalo, že skúšku KeratinoSens™ je možné použiť v prípade testovaných chemikálií zahŕňajúcich viacero organických funkčných skupín, reakčných mechanizmov, potencií senzibilizačných účinkov na pokožku (stanovených štúdiami *in vivo*) a fyzikálno-chemických vlastností (9) (12) (13) (14). Testovali sa najmä jednozložkové látky, hoci obmedzené množstvo údajov existuje aj z testovania zmesí (20). Táto testovacia metóda je napriek tomu technicky použiteľná aj na testovanie viaczložkových látok a zmesí. V prípade zmesí by sa však pred použitím tejto testovacej metódy na generovanie údajov plánovaných na regulačné účely malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na daný účel a ak áno, prečo. Takéto úvahy nie sú potrebné v prípade, že existuje regulačná požiadavka na testovanie zmesi. Okrem toho by sa pri testovaní viaczložkových látok alebo zmesí mala zvážiť možná interferencia medzi cytotoxickými zložkami a pozorovanými reakciami. Táto testovacia metóda sa používa pri testovaných chemikáliách, ktoré sú rozpustné alebo vytvárajú stabilné disperzie (t. j. koloid alebo suspenziu, v ktorej sa testovaná chemikália neusadí alebo neoddelí od rozpúšťadla do rôznych fáz) buď vo vode, alebo DMSO (vrátane všetkých zložiek testovanej chemikálie v prípade testovania viaczložkových látok alebo zmesi). Testované chemikálie, ktoré nespĺňajú tieto podmienky pri najvyššej konečnej koncentrácii 2 000 μM (pozri bod 22), sa môžu stále testovať pri nižších koncentráciách. V takom prípade by sa výsledky, ktoré spĺňajú kritériá pozitivity opísané v bode 39, mohli ďalej použiť na pomoc pri identifikácii testovanej chemikálie ako kožného senzibilizátora, pričom negatívny výsledok získaný pri koncentráciách < 1 000 μM by sa mal považovať za nejednoznačný (pozri model prognózy v bode 39). Vo všeobecnosti boli úspešne testované látky s LogP do 5, pričom silne hydrofóbne látky s LogP nad 7 sú mimo rozsahu známej použiteľnosti tejto testovacej metódy (14). V prípade látok s LogP od 5 do 7 sú dostupné iba obmedzené informácie.

Negatívne výsledky by sa mali interpretovať opatrne, pretože látky reagujúce výlučne na rezíduá lyzínu sa môžu pri tejto metóde ukázať ako negatívne. Okrem toho môžu z dôvodu obmedzenej metabolickej kapacity použitej bunkovej línie (21) a experimentálnych podmienok vykazovať negatívne výsledky aj prohaptény (t. j. chemikálie, ktoré musia byť aktivované enzymaticky, napríklad enzýmami P 450) a prehaptény (t. j. chemikálie aktivované autooxidáciou), zvlášť tie s pomalou oxidáciou. Na druhej strane, testované chemikálie, ktoré sa nesprávajú ako senzibilizátory, ale sú chemickými stresormi, môžu vykazovať falošné pozitívne výsledky (14). Okrem toho vysoko cytotoxické testované chemikálie nemožno vždy spoľahlivo posúdiť. Napokon treba

▼M7

uviesť aj to, že testované chemikálie, ktoré interferujú s luciferázou, môžu negatívne ovplyvniť činnosť luciferázy v bunkových testoch, a to buď zdanlivou inhibíciou, alebo zvýšenou luminiscenciou (22). V iných skúškach s reportérovými génmi luciferázy boli napríklad zaznamenané aj interferencie fytoestrogénu v koncentráciách nad 1 μM s luminiscenčnými signálmi z dôvodu nadmernej aktivácie reportérových génov luciferázy (23). Preto treba všetky prejavy luciferázy získané pri vysokých koncentráciách fytoestrogénov alebo podobných chemikálií, ktoré môžu, rovnako ako fytoestrogény, vyvolať nadmernú aktiváciu reportérových génov luciferázy, dôkladne preskúmať (23). V prípade, že existujú dôkazy o nepoužiteľnosti tejto testovacej metódy na iné špecifické kategórie testovaných chemikálií, by sa táto testovacia metóda nemala pri týchto špecifických kategóriách použiť.

Okrem pomoci pri rozlišovaní medzi kožnými senzibilizátormi a látkami, ktoré senzibilizáciu nespôsobujú, slúži skúška KeratinoSens™ aj na získavanie informácií o vzťahu medzi koncentráciou a reakciou, ktorý môže prispieť k hodnoteniu potencie senzibilizačných pri použití integrovaných prístupov, ako je napríklad IATA (19). Je však potrebné vyvinúť ďalšie úsilie, aby sa, najlepšie na základe spoľahlivých údajov získaných u ľudí, dalo určiť, akým spôsobom môžu výsledky skúšky KeratinoSens™ prispieť k hodnoteniu potencie (24) a ku kategorizácii senzibilizátorov do podkategórií podľa GHS OSN/CLP.

PRINCÍP TESTU

Testovacia metóda „ARE-Nrf2 luciferáza“ využíva imortalizovanú adherentnú bunkovú líniu získanú z ľudských keratinocytov HaCaT transfektovaných stabilne so zvoleným plazmidom. Táto bunková línia obsahuje gén luciferázy s transkripciou kontrolovanou konštitutívnym promotérom zlúčeným s prvkom ARE z génu o ktorom je známe, že sa vyznačuje zvýšenou reguláciou vyvolanou kontaktnými senzibilizátormi (25) (26). Signalizácia luciferázy je výsledkom aktivácie endogénnych Nrf2 dependentných génov vyvolanej senzibilizátormi, pričom bola preukázaná závislosť signalizácie luciferázy v rekombinantnej bunkovej línii od Nrf2 (27). To umožňuje kvantitatívne merania (luminiscenčnou detekciou) indukcie génu luciferázy použitím dobre známych luminiscenčných substrátov s obsahom luciferázy, ktoré sú ukazovateľom aktivity transkripčného faktora Nrf2 v bunkách následkom expozície účinkom elektrofilných látok.

Testované chemikálie sa v skúške KeratinoSens™ považujú za pozitívne, ak vyvolajú takú štatisticky významnú indukciu aktivity luciferázy presahujúcu stanovený limit [t. j. viac ako 1,5-násobne alebo o 50 %) do výšky definovanej koncentrácie, ktorá významne neovplyvní životaschopnosť buniek (t. j. menej ako 1 000 μM a pri koncentrácii, ktorá zaručuje životaschopnosť buniek nad 70 % (9) (12)]. Na tento účel sa stanoví maximálny násobok indukcie aktivity luciferázy v porovnaní s (negatívnou) kontrolou s rozpúšťadlom (I_{max}). Okrem toho, keďže bunky sú vystavené pôsobeniu série koncentrácií testovaných chemikálií, by sa koncentrácia potrebná na účely štatisticky významnej indukcie aktivity luciferázy, ktorá prekročí limitnú hodnotu (t. j. hodnotu $EC_{1,5}$) mala interpolovať z krivky závislosti reakcie od dávky (pozri výpočty v bode 32). Nakoniec by sa mali vykonať paralelné merania cytotoxicity, aby sa posúdilo, či sú indukčné hodnoty aktivity luciferázy pod úrovňou cytotoxických koncentrácií.

Pred rutinným použitím skúšky ARE-Nrf2 luciferáza, ktorá zodpovedá požiadavkám tejto testovacej metódy, by mali laboratória preukázať technickú spôsobilosť použitím desiatich chemikálií na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2.

Normy výkonnosti (28) sú k dispozícii na to, aby uľahčili validáciu nových alebo modifikovaných *in vitro* testovacích metód „ARE-Nrf2 luciferáza“ podobných skúške KeratinoSens™ a umožnili včasnú úpravu tejto testovacej metódy pre ich zaradenie. Vzájomné uznávanie údajov (MAD) podľa dohody OECD je možné garantovať len v prípade testovacích metód validovaných podľa noriem výkonnosti v prípade, že tieto metódy boli preskúmané a zaradené do príslušných usmernení OECD na vykonávanie testov.

▼M7

POSTUP

V súčasnosti existuje v rámci tejto testovacej metódy jediná vedecky overená metóda – skúška KeratinoSens™ (9) (12) (13) (14). Ku skúške KeratinoSens™ boli vypracované štandardné prevádzkové postupy a mali by sa používať pri zavádzaní a využívaní tejto testovacej metódy v laboratóriu (15). Laboratóriá ochotné zaviesť túto testovaciu metódu môžu získať rekombinovanú bunkovú líniu používanú pri skúške KeratinoSens™ uzavretím licenčnej zmluvy so spoločnosťou, ktorá túto testovaciu metódu vyvinula. V nasledujúcich bodoch sú opísané základné zložky a postupy pri testovacej metóde ARE-Nrf2 luciferáza.

Príprava keratínocytových kultúr

Mala by sa použiť transgénová bunková línia so stabilným reportérovým génom luciferázy kontrolovaným prvkom ARE (napr. bunková línia KeratinoSens™). Po prijatí sa bunky namnožia (napr. na 2 až 4 pasáže) a skladujú zmrazené ako homogénny materiál. Bunky z tohto uskladneného materiálu sa namnožia na maximálny počet pasáží (t. j. 25 v prípade KeratinoSens™) a podrobia rutinnému testovaniu použitím vhodného udržiavacieho média (v prípade KeratinoSens™ ide o DMEM s obsahom séra a geneticínu).

Na účely testovania by bunky mali byť z 80 – 90 % konfluentné, pričom treba dbať na to, aby nikdy nedošlo k úplnej konfluencii. Deň pred testovaním sa bunky odoberú a rozdelia na platničky s 96 jamkami (v prípade KeratinoSens™ pripadá na jednu jamku 10 000 buniek). Treba dbať na to, aby pri dávkovaní nedošlo k sedimentácii buniek a bunky boli do jednotlivých jamiek rozdelené rovnomerne. V opačnom prípade môžu jednotlivé jamky vykazovať výrazne odlišné hodnoty. Pri každom opakovaní sa na meranie aktivity luciferázy použijú tri replikáty, pričom jeden paralelný replikát sa použije na skúšku životaschopnosti buniek.

Príprava testovanej chemikálie a kontrolných látok

Testovaná chemikália a kontrolné látky sa pripravujú v deň testovania. V prípade skúšky KeratinoSens™ sa testované chemikálie rozpustia v dimetylsulfoxide (DMSO) na konečnú želanú koncentráciu (napr. 200 mM). Roztoky DMSO možno považovať za samosterilizujúce, preto nie je potrebná žiadna sterilná filtrácia. Testovaná chemikália, ktorá nie je rozpustná v DMSO, sa rozpustí v sterilnej vode alebo kultivačnom médiu a roztoky sa sterilizujú napr. filtráciou. V prípade testovanej chemikálie, ktorá nemá definovanú molekulovú hmotnosť (MH), sa pripraví zásobný roztok s koncentráciou (40 mg/ml alebo 4 hm. %), ktorá je pre skúšku KeratinoSens™ štandardná. Použitie iných rozpúšťadiel ako DMSO, voda alebo kultivačné médium treba náležite zdôvodniť.

Zo zásobných roztokov DMSO testovanej chemikálie sa extrakt sériovo riedi použitím DMSO tak, aby sa získalo 12 základných koncentrácií testovanej chemikálie (od 0,098 do 200 mM pri skúške KeratinoSens™). V prípade testovanej chemikálie, ktorá nie je rozpustná v DMSO, dochádza k riedeniu na získanie základných koncentrácií použitím sterilnej vody alebo sterilného kultivačného média. Nezávisle od použitého rozpúšťadla sa základné koncentrácie ďalej 25-krát zriedia v kultivačnom médiu s obsahom séra a nakoniec sa upravia ďalším 4-násobným faktorom riedenia tak, aby bol rozsah konečných koncentrácií testovanej chemikálie pri skúške KeratinoSens™ v rozmedzí od 0,98 do 2 000 μM. Môžu sa použiť aj alternatívne koncentrácie (napr. v prípade cytotoxicity alebo slabej rozpustnosti), ak sa zdôvodnia.

Negatívna kontrola (s rozpúšťadlom) používaná pri skúške KeratinoSens™ je DMSO (CAS č. 67-68-5, ≥ 99 % čistoty), ktorá sa dávkuje do šiestich jamiek na každej platničke. Prejde rovnakým riedením ako v prípade základných koncentrácií, ktorý je opísaný v bode 22, a to tak, aby výsledná negatívna

▼M7

kontrola (s rozpúšťadlom) bola 1 %, pričom je o nej známe, že neovplyvňuje životaschopnosť buniek a má rovnakú koncentráciu ako DMSO zistenú v testovanej chemikálii a pozitívnej kontrole. V prípade testovanej chemikálie nerozpustnej v DMSO, ktorá sa riedila vo vode, sa musí koncentrácia DMSO vo všetkých jamkách upraviť na 1 % tak, ako v prípade ostatných testovaných chemikálií a kontrolných látok.

Pozitívnou kontrolou používanou pri skúške KeratinoSens™ je aldehyd kyseliny škoricovej (CAS č. 14371-10-9, s čistotou ≥ 98 %), z ktorého sa v DMSO (zásobný roztok s koncentráciou 6,4 mM) pripravia série 5 základných koncentrácií v rozmedzí od 0,4 do 6,4 mM a zriedia postupom opísaným pri základných koncentráciách v bode 22 tak, aby sa konečná koncentrácia pozitívnej kontroly pohybovala od 4 do 64 μM. Môžu sa použiť aj iné pozitívne kontroly, najlepšie také, ktoré umožnia dosiahnuť hodnotu $EC_{1,5}$ pri strednom rozsahu, ak existujú predchádzajúce údaje, z ktorých sa dajú odvodiť porovnateľné kritériá prijateľnosti vykonania testu.

Použitie testovanej chemikálie a kontrolných látok

Pri každej testovanej chemikálii a pozitívnej kontrole je potrebné vykonať jeden pokus na odvodenie prognózy (pozitívnej alebo negatívnej), ktorý pozostáva najmenej z dvoch nezávislých opakovaní s každým z troch replikátov (t. j. n = 6). Ak sa výsledky z dvoch nezávislých opakovaní nezhodujú, je potrebné vykonať tretie opakovanie s tromi replikátmi (t. j. n = 9). Každé nezávislé opakovanie sa vykoná v iný deň, s čerstvým zásobným roztokom testovaných chemikálií a s nezávisle odobratými bunkami. Bunky však môžu pochádzať z tej istej pasáže.

Po nadávkovaní opísanom v bode 20 sa bunky kultivujú 24 hodín v platničkách s 96 jamkami. Potom sa médium odstráni a nahradí čerstvým kultivačným médiom (v prípade skúšky KeratinoSens™ je to150 μl kultivačného média s obsahom séra bez geneticínu), do ktorého sa pridá 50 μl 25-násobne zriedenej testovanej chemikálie a kontrolných látok. Na každej platničke s jamkami sa nechá aspoň jedna jamka prázdna (bez buniek a bez ovplyvnenia), aby sa skontrolovali pozaďové hodnoty.

Ovplyvnené platničky s jamkami sa potom inkubujú 48 hodín pri teplote 37 ± 1 °C za prítomnosti 5 % CO_2 v prípade skúšky KeratinoSens™. Treba dbať na to, aby sa zabránilo vyparovaniu prchavých testovaných chemikálií a krížovej kontaminácii medzi jamkami s testovanými chemikáliami. napr. zakrytím platničiek fóliou pred ich inkubáciou.

Merania aktivity luciferázy

Na odčítanie správnych hodnôt luciferázy sú kľúčové tri faktory:

— výber citlivého luminometra,

— použitie misky s dostatočnou výškou, aby sa zabránilo miernej krížovej kontaminácii a

— použitie substrátu luciferázy s dostatočným svetelným výkonom na zaručenie dostatočnej citlivosti a nízkej variability.

Pred testovaním je potrebné skontrolovať vybavenie na vykonanie skúšky opísané v dodatku 3, aby sa zabezpečilo splnenie týchto troch bodov.

Po 48-hodinovej expozícii s testovanou chemikáliou a kontrolnými látkami pri skúške KeratinoSens™ sa bunky opláchnu fosfátovým tlmivým fyziologickým roztokom a na účely odčítania luminiscenčných hodnôt sa do každej jamky pridá pri izbovej teplote na 20 minút príslušný lyzačný tlmivý roztok.

▼M7

Platničky s bunkovým lyzátom sa potom umiestnia do luminometra, ktorý je pri skúške KeratinoSens™ naprogramovaný tak, aby: i) do každej jamky pridal substrát luciferázy (t. j. 50 µl), ii) počkal 1 sekundu a iii) na 2 sekundy zlúčil aktivitu luciferázy. Ak sa použijú alternatívne nastavenia, napr. v závislosti od použitého modelu luminometra, mali by sa zdôvodniť. Okrem toho je možné použiť aj luminiscenčný substrát za predpokladu, že bol úspešne vykonaný pokus na kontrolu kvality opísaný v dodatku 3.

Hodnotenie cytotoxicity

Pri skúške životaschopnosti buniek KeratinoSens™ sa médium po 48 hodinách expozície nahradí čerstvým médiom s obsahom MTT, t. j. 2,5-difenyl-3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)tetrazólium-bromidu alebo tiazolylovej modrej tetrazólium-bromidu; (CAS č. 298-93-1), pričom bunky sa inkubujú 4 hodiny pri teplote 37 °C v prítomnosti 5 % CO_2. MTT médium sa potom odstráni a bunky sa cez noc lyzujú (napr. pridaním 10 % roztoku SDS do každej jamky). Po pretrepaní sa fotometrom zmeria absorpcia pri 600 nm.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Hodnotenie údajov

Pri skúške KeratinoSens™ sa vypočítavajú tieto parametre:

— hodnota maximálneho priemerného násobku indukcie aktivity luciferázy (I_{max}) pozorovaná pri každej koncentrácii testovanej chemikálie a pozitívnej kontroly;

— hodnota $EC_{1,5}$ predstavujúca koncentráciu, pri ktorej dochádza k indukcii aktivity luciferázy prekračujúcej limitnú hodnotu 1,5-násobku (t. j. 50 % zvýšenú aktivitu luciferázy) a

— hodnoty koncentrácie IC_{50} a IC_{30} pre 50 % a 30 % zníženie životaschopnosti buniek.

— Násobok indukcie aktivity luciferázy sa vypočíta podľa rovnice 1, a celkový maximálny násobok indukcie (I_{max}) sa vypočíta ako priemer z jednotlivých opakovaní.

Rovnica 1:

$$Násobok\ indukcie = \frac{(L_{sample} - L_{blank})}{(L_{solvent} - L_{blank})}$$

kde

L_{sample} je hodnota luminiscencie odčítaná v jamke s testovanou chemikáliou

L_{blank} je hodnota luminiscencie odčítaná v „slepej“ jamke, t. j. bez buniek a ovplyvnenia

$L_{solvent}$ je hodnota priemernej luminiscencie odčítaná v jamkách obsahujúcich bunky a (negatívnu) kontrolu s rozpúšťadlom

hodnota $EC_{1,5}$ sa vypočíta lineárnou interpoláciou podľa rovnice 2 a celková hodnota $EC_{1,5}$ sa vypočíta ako geometrický priemer jednotlivých opakovaní.

Rovnica 2:

$$EC1{,}5 = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1{,}5 - I_\alpha}{I_b - I_\alpha}\right) + C_\alpha$$

▼M7

kde

C_a je najnižšia koncentrácia v µM s viac ako 1,5-násobnou indukciou

C_b je najvyššia koncentrácia v µM s menej ako 1,5-násobnou indukciou

I_a je násobok indukcie meraný pri najnižšej koncentrácii s viac ako 1,5-násobnou indukciou (priemer troch jamiek s replikátmi)

I_b je násobok indukcie meraný pri najnižšej koncentrácii s menej ako 1,5-násobnou indukciou (priemer troch jamiek s replikátmi)

Životaschopnosť sa vypočíta pomocou rovnice 3:

rovnica 3:

$$Životaschopnosť = \frac{(V_{sample} - V_{blank})}{V_{solvent} - V_{blank}} \times 100$$

kde

V_{sample} je hodnota absorbancie MTT odčítaná v jamke s testovanou chemikáliou

V_{blank} je hodnota absorbancie MTT odčítaná v „slepej“ jamke, t. j. bez buniek a ovplyvnenia

$V_{solvent}$ je hodnota priemernej absorbancie MTT odčítaná v jamkách obsahujúcich bunky a (negatívnu) kontrolu s rozpúšťadlom

hodnoty IC_{50} a IC_{30} sa vypočítajú lineárnou interpoláciou podľa rovnice 4 a celkové hodnoty IC_{50} a IC_{30} sa vypočítajú ako geometrický priemer jednotlivých opakovaní.

rovnica 4:

$$IC_x = (C_b - C_\alpha) \times \left(\frac{(100 - x) - V_\alpha}{V_b - V_\alpha}\right) + C_\alpha$$

kde

X je percento zníženia pri koncentrácii, ktorá sa má vypočítať (50 a 30 v prípade IC_{50} a IC_{30})

C_a je najnižšia koncentrácia v µM s viac ako x percentným znížením životaschopnosti

C_b je najvyššia koncentrácia v µM s menej ako x percentným znížením životaschopnosti

V_a je percento životaschopnosti pri najnižšej koncentrácii s viac ako x percentným znížením životaschopnosti

V_b je percento životaschopnosti pri najvyššej koncentrácii s menej ako x percentným znížením životaschopnosti

Pre každú koncentráciu vykazujúcu viac ako 1,5-násobnú indukciu aktivity luciferázy sa vypočíta štatistická významnosť (napr. dvojvýberovým Studentovým t-testom), pričom sa porovnajú hodnoty luminiscencie v prípade troch vzoriek replikátov s hodnotami luminiscencie v jamkách s negatívnou kontrolou s rozpúšťadlom, aby sa zistilo, či je indukcia aktivity luciferázy štatisticky významná ($p < 0,05$). Najnižšia koncentrácia s viac ako 1,5-násobnou indukciou aktivity luciferázy je hodnota, ktorá určuje hodnotu $EC_{1,5}$. V každom prípade sa kontroluje, či je táto hodnota nižšia ako hodnota IC_{30}, čo znamená, že ide o menej ako 30 % zníženie životaschopnosti buniek pri rozhodujúcej koncentrácii $EC_{1,5}$.

▼M7

Odporúča sa údaje vizuálne skontrolovať pomocou grafov. Ak nemožno vyvodiť jednoznačnú krivku závislosti reakcie od dávky, alebo ak má získaná krivka dve fázy (t. j. dvakrát došlo k prekročeniu limitu 1,5), pokus by sa mal zopakovať, aby sa overilo, či sa tak stalo z dôvodu, ktorý je špecifický pre danú testovanú chemikáliu, alebo ide o vedľajší účinok experimentu. Ak je dvojfázová odozva reprodukovateľná v nezávislom pokuse, zaznamená sa nižšia hodnota $EC_{1,5}$ (t. j. koncentrácia, pri ktorej bol limit 1,5 prekročený po prvýkrát).

Vo výnimočných prípadoch, keď dôjde k štatisticky nevýznamnej indukcii prekračujúcej limit 1,5-násobku a následne k zvýšeniu koncentrácie pri štatisticky významnej indukcii, výsledky z opakovania sa považujú za platné a pozitívne, ak sa štatisticky významná indukcia prekračujúca limit 1,5 dosiahla pre necytotoxickú koncentráciu.

Nakoniec sa na základe vizuálnej kontroly krivky závislosti reakcie od dávky v prípade testovaných chemikálií vykazujúcich 1,5-násobnú alebo vyššiu indukciu už pri najnižších testovaných koncentráciách 0,98 μM, stanoví hodnota $EC_{1,5}$, ktorá je nižšia ako 0,98.

Kritériá prijateľnosti

Pri použití skúšky KeratinoSens™ by mali byť splnené tieto kritériá prijateľnosti. Po prvé, indukcia aktivity luciferázy získaná s pozitívnou kontrolou – aldehydom kyseliny škoricovej – by mala byť štatisticky významná nad limitom 1,5 (napr. použitím T-testu) aspoň pri jednej z testovaných koncentrácií (od 4 do 64 μM).

Po druhé, hodnota $EC_{1,5}$ by mala byť v rozmedzí dvoch štandardných odchýlok historického priemeru testovacieho zariadenia (napr. medzi 7 μM a 30 μM podľa súboru validačných údajov) a mala by sa pravidelne aktualizovať. Navyše hodnota priemernej indukcie v troch replikátoch v prípade aldehydu kyseliny škoricovej s koncentráciou 64 μM by mala byť medzi 2 a 8. Ak toto kritérium nie je splnené, mala by sa dôkladne skontrolovať závislosť reakcie od dávky aldehydu kyseliny škoricovej, pričom testy možno považovať za prijateľné iba v prípade, že je pri pozitívnej kontrole zrejmá jednoznačná závislosť reakcie od dávky pri rastúcej indukcii aktivity luciferázy.

Napokon by sa pri každom opakovaní pozostávajúcom zo 6 jamiek testovaných v triplikátoch mal dosiahnuť priemerný koeficient odchýlky odčítanej hodnoty luminiscencie v prípade negatívne kontroly DMSO (s rozpúšťadlom), ktorý je nižší ako 20 %. Ak sú odchýlky vyššie, výsledky by sa mali zrušiť.

Interpretácia výsledkov a model prognózy

Prognóza sa pri skúške KeratinoSens™ považuje za pozitívnu, ak sú splnené uvedené 4 podmienky v 2 z 2 alebo v tých istých 2 z 3 opakovaní. Inak sa prognóza považuje za negatívnu (obrázok 1):

1. hodnota I_{max} je vyššia ako (>) 1,5-násobok a štatisticky významne odlišná v porovnaní s (negatívnou) kontrolou s rozpúšťadlom (na základe stanovenia dvojvýberovým, nepárovým Studentovým t-testom);

2. životaschopnosť buniek je vyššia ako (>) 70 % pri najnižšej koncentrácii s viac ako 1,5-násobnou indukciou aktivity luciferázy (t. j. pri rozhodujúcej koncentrácii $EC_{1,5}$);

3. hodnota $EC_{1,5}$ je nižšia (<) ako 1 000 μM (alebo nižšia ako 200 μg/ml pri testovaných chemikáliách s nedefinovanou MH);

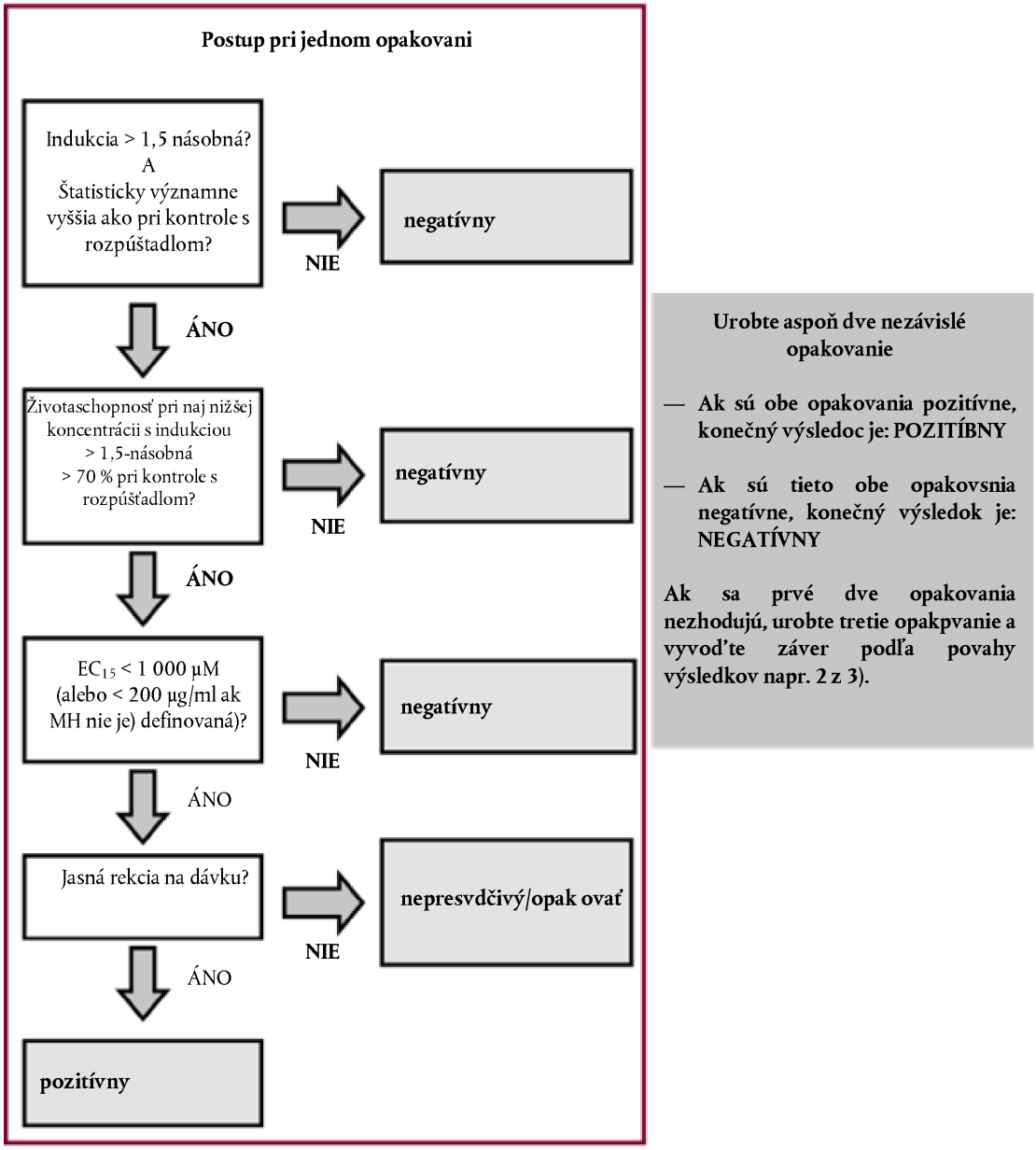
4. celková závislosť reakcie od dávky (alebo dvojfázová reakcia podľa bodu 33) je v prípade indukcie luciferázy jednoznačná.

▼M7

Ak sú pri niektorom z opakovaní splnené všetky tri prvé podmienky, ale nie je možné pozorovať vzťah medzi reakciou a dávkou pri indukcii luciferázy, tak by sa výsledok daného opakovania mal považovať za nejednoznačný a môže byť potrebné ďalšie testovanie (obrázok 1). Navyše aj negatívny výsledok získaný pri koncentráciách < 1 000 µM (alebo < 200 µg/ml v prípade testovaných chemikálií s nedefinovanou MH) by sa mal považovať za nejednoznačný (pozri bod 11).

Obrázok 1

Model prognózy používaný pri skúške KeratinoSens™. Prognóza KeratinoSens™ by sa mala posudzovať v rámci IATA a v súlade s ustanoveniami bodov 9 a 11.



V zriedkavých prípadoch môžu byť testované chemikálie, ktoré indukujú aktivitu luciferázy pri úrovniach veľmi blízkych cytotoxicite, pozitívne pri niektorých opakovaniach pri necytotoxických úrovniach (t. j. rozhodujúca koncentrácia $EC_{1,5}$ je nižšia (<) ako IC_{30}), ako aj pri iných opakovaniach iba pri cytotoxických úrovniach (t. j. rozhodujúca koncentrácia $EC_{1,5}$ je vyššia (>) ako IC_{30}). Tieto testované chemikálie sa musia opakovane testovať použitím podrobnejšej analýzy

▼M7

vzťahu medzi reakciou a dávkou s nižším faktorom riedenia (napr. 1,33 alebo √2 (= 1,41) násobné riedenie medzi jamkami), aby sa zistilo, či pri cytotoxických úrovniach došlo k indukcii alebo nie (9).

Skúšobný protokol

Skúšobný protokol by mal obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália

— Jednozložková látka

  — Chemická identifikácia, ako napríklad názov, resp. názvy podľa IUPAC alebo CAS, číslo(-a) CAS, kód SMILES alebo InChI, štrukturálny vzorec a/alebo iné identifikátory;

  — fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode, rozpustnosť v DMSO, molekulová hmotnosť a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti, v dostupnom rozsahu;

  — čistota, chemická identita nečistôt, ak je potrebná a prakticky realizovateľná atď.;

  — v uplatniteľnom prípade úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie),

  — testovaná koncentrácia, resp. koncentrácie

  — podmienky skladovania a stability v dostupnom rozsahu.

— Mnohozložková látka, UVCB a zmes:

  — pokiaľ možno čo najpodrobnejšia charakterizácia, napr. prostredníctvom chemickej identity (pozri vyššie), čistoty, kvantitatívneho výskytu a relevantných fyzikálno-chemických vlastností (pozri vyššie) zložiek v dostupnom rozsahu;

  — fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode, rozpustnosť v DMSO a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti, v dostupnom rozsahu;

  — molekulová hmotnosť alebo zjavná molekulová hmotnosť v prípade zmesí/polymérov známeho zloženia alebo iné informácie potrebné na vykonanie štúdie;

  — v uplatniteľnom prípade úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie),

  — testovaná koncentrácia, resp. koncentrácie

  — podmienky skladovania a stability v dostupnom rozsahu.

Kontroly

— Pozitívna kontrola

  — Chemická identifikácia, ako napríklad názov, resp. názvy podľa IUPAC alebo CAS, číslo(-a) CAS, kód SMILES alebo InChI, štrukturálny vzorec a/alebo iné identifikátory;

  — fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode, rozpustnosť v DMSO, molekulová hmotnosť a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti, v dostupnom rozsahu a podľa potreby;

  — čistota, chemická identita nečistôt, ak je potrebná a prakticky realizovateľná atď.;

  — v uplatniteľnom prípade úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie);

  — testovaná koncentrácia, resp. koncentrácie;

  — podmienky skladovania a stability v dostupnom rozsahu;

▼M7

— v uplatniteľnom prípade odkaz na predchádzajúce výsledky s pozitívnymi kontrolami dokazujúce vhodné kritériá prijateľnosti vykonania testu.

— Negatívna kontrola (nosič)

— Chemická identifikácia, ako napríklad názov, resp. názvy podľa IUPAC alebo CAS, číslo(-a) CAS a/alebo iné identifikátory;

— čistota, chemická identita nečistôt, ak je potrebná a prakticky realizovateľná atď.;

— fyzický vzhľad, molekulová hmotnosť a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v prípade, že sa použijú iné negatívne kontroly/nosiče ako tie uvedené v tejto testovacej metóde, a to v dostupnom rozsahu;

— podmienky skladovania a stability v dostupnom rozsahu;

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla pre každú testovanú chemikáliu.

Podmienky testovacej metódy

— Meno a adresa objednávateľa, testovacieho zariadenia a vedúceho štúdie;

— opis použitej testovacej metódy;

— bunková línia, podmienky jej skladovania a zdroj (napr. zariadenie, z ktorého boli získané);

— číslo pasáže a miera konfluencie buniek použitých na testovanie;

— metóda stanovenia počtu buniek používaná na dávkovanie pred testovaním a opatrenia, ktorými sa zaručí rovnomerné rozdelenie buniek (pozri bod 20);

— použitý luminometer (napr. typ/model) vrátane jeho nastavenia, použitého substrátu luciferázy a potvrdenie adekvátnych meraní luminiscencie merania založených na kontrolnom teste opísanom v dodatku 3;

— postup použitý na preukázanie spôsobilosti laboratória vykonávať danú testovaciu metódu (napr. testovaním chemikálií na preukázanie spôsobilosti) alebo na preukázanie reprodukovateľnosti výkonu testovacej metódy aj neskôr.

Postup vykonania testu

— Počet opakovaní a použitých replikátov;

— koncentrácie testovaných chemikálií, postup ich použitia a použitý čas expozície (ak je iný ako odporúčaný)

— opis použitých kritérií hodnotenia a rozhodovania;

— opis použitých kritérií prijateľnosti štúdie;

— opis všetkých zmien v postupe vykonania testu.

Výsledky

— Tabuľkový zápis hodnôt I_{max}, $EC_{1,5}$ a životaschopnosti (t. j. hodnôt IC_{50}, IC_{30}) získaných pri testovanej chemikálii a pozitívnej kontrole pri každom opakovaní, ako aj hodnôt priemeru (I_{max}: priemer; hodnota $EC_{1,5}$ a hodnoty životaschopnosti: geometrický priemer) a SD vypočítané použitím údajov z každého jednotlivého opakovania a údaj o ratingu testovanej chemikálie podľa modelu prognózy;

▼M7

— koeficient odchýlky získaný odčítaním hodnôt luminiscencie pri negatívnej kontrole pri každom pokuse;

— graf zobrazujúci krivky závislosti reakcie od dávky z hľadiska aktivity luciferázy a životaschopnosti;

— v uplatniteľnom prípade opis všetkých relevantných pozorovaní.

Rozbor výsledkov

— Rozbor dosiahnutých výsledkov pri skúške KeratinoSens™;

— posúdenie výsledkov testovacej metódy v kontexte IATA, ak sú k dispozícii iné relevantné informácie.

Záver

LITERATÚRA

1. Organizácia Spojených národov (OSN) (2013). Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – GHS), piate prepracované vydanie, OSN New York a Ženeva, 2013. K dispozícii na: 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, Paríž.

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. Kapitola B.42 tejto prílohy: Kožná senzibilizácia: lokálna skúška lymfatických uzlín.

5. Kapitola B.6 tejto prílohy: Kožná senzibilizácia.

6. Kapitola B.50 tejto prílohy: Kožná senzibilizácia: lokálna skúška lymfatických uzlín: DA.

7. Kapitola B.51 tejto prílohy: Kožná senzibilizácia: lokálna skúška lymfatických uzlín: 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. K dispozícii na webovej lokalite: 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. K dispozícii na webovej lokalite: 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

Dodatok 1

DEFINÍCIE

Presnosť: Miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Týka sa výkonnosti testovacej metódy a jedného z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (29).

AOP (dráha nepriaznivého účinku): sled udalostí počnúc chemickou štruktúrou cieľovej chemikálie alebo skupiny podobných chemikálií vyvolaných molekulárnou iniciáciou až po výsledok *in vivo*, ktorý je predmetom záujmu (2).

ARE: antioxidačný reakčný element (nazývaný aj EpRE – elektrofilný reakčný element) je reakčný element, ktorý sa v prípade mnohých cytoprotektívnych génov a génov fázy II nachádza v „upstream“ oblasti promótoru. Ak sa aktivuje prostredníctvom Nrf2, napomáha transkripčnú indukciu týchto génov.

Chemikália: látka alebo zmes.

Variačný koeficient: týka sa variability, ktorá sa v prípade skupiny opakovaných údajov vypočítava vydelením štandardnej odchýlky od priemeru. Môže sa vynásobiť faktorom 100 a vyjadriť v percentách.

$EC_{1,5}$: interpolovaná koncentrácia v prípade 1,5-násobnej indukcie luciferázy.

IC_{30}: koncentrácia vyvolávajúca zníženie životaschopnosti buniek o 30 %.

IC_{50}: koncentrácia vyvolávajúca zníženie životaschopnosti buniek o 50 %.

Nebezpečenstvo (ohrozenie): inherentná vlastnosť činidla, prípadne situácia, ktorá môže vyvolať nepriaznivé účinky pri expozícii organizmu, systému alebo (sub)populácie účinkom daného činidla.

IATA (integrovaný prístup k testovaniu a hodnoteniu): štruktúrovaný prístup používaný na identifikáciu (potenciálneho) nebezpečenstva, charakterizáciu nebezpečenstva (z hľadiska potencie) a/alebo hodnotenie bezpečnosti (potenciál/potencia a expozícia) chemikálie alebo skupiny chemikálií, ktorý strategicky integruje a porovnáva všetky relevantné údaje v záujme prijatia právneho rozhodnutia o potenciálnom nebezpečenstve a/alebo riziku a/alebo potrebe vykonania ďalších cielených, t. j. minimálnych testov.

I_{max}: maximálny faktor indukcie aktivity luciferázy v porovnaní s (negatívnou) kontrolou s rozpúšťadlom nameraný pri ktorejkoľvek koncentrácii testovanej chemikálie.

Keap1: je senzorový proteín (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), ktorý dokáže regulovať aktivitu Nrf2. Za podmienok bez indukcie vyhľadáva senzorový proteín Keap1 transkripčný faktor Nrf2, pričom dochádza k ubikvitinácii a proteolytickej degradácii v proteazóme. Kovalentná modifikácia rezíduí reakčného cysteínu v proteíne Keap1 spôsobená malými molekulami môže viesť k oddeleniu Nrf2 od Keap1 [8) (10) (11)].

▼M7

Zmes: zmes alebo roztok zložený z dvoch alebo viacerých látok, ktoré spolu nereagujú (1).

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej do 80 hm. %.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii ≥ 10 hm. % a < 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo k chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

Nrf2: nukleárny faktor [*(erythroid-derived 2)-like 2*] je transkripčný faktor, ktorý je súčasťou antioxidačnej reakčnej dráhy. Ak Nrf2 nie je ubikvitinovaný, začne sa tvoriť v cytoplazme a presúva sa do jadra, kde sa v prípade mnohých cytoprotektívnych génov spája v „upstream“ oblasti promótoru s ARE a spustí ich transkripciu (8) (10) (11).

Pozitívna kontrola: replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému, ktorý je ovplyvnený látkou, o ktorej je známe, že vyvoláva pozitívnu reakciu. Aby bolo možné vyhodnotiť variabilitu spätnej reakcie na pozitívnu kontrolu v čase, nesmie byť jej veľkosť extrémne silná.

Relevantnosť: opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu a zmysluplnosti a užitočnosti testu na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej test správne meria alebo prognózuje biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testovacej metódy (29).

Spoľahlivosť: meria rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Hodnotí sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a vnútrolaboratórnej opakovateľnosti (29).

Reprodukovateľnosť: zhoda výsledkov získaných testovaním tej istej chemikálie s použitím toho istého skúšobného protokolu (pozri spoľahlivosť) (29).

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií správne klasifikovaných testovacou metódou. Ide o presnosť testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky a musí sa zohľadniť pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (29).

Kontrola s rozpúšťadlom/nosičom: replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému okrem testovanej chemikálie, ale vrátane použitého rozpúšťadla. Používa sa na zistenie základnej spätnej reakcie vzoriek ovplyvnených testovanou chemikáliou rozpustenou v tom istom rozpúšťadle.

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií správne klasifikovaných testovacou metódou. Ide o presnosť testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky a musí sa zohľadniť pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (29).

Látka: chemické prvky a ich zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané pomocou akéhokoľvek výrobného procesu vrátane všetkých prísad potrebných na uchovanie stability výrobku a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, no s vylúčením všetkých rozpúšťadiel, ktoré je možné oddeliť bez toho, aby ovplyvnili stabilitu látky alebo zmenili jej zloženie (1).

Testovaná chemikália: pojem „testovaná chemikália“ sa používa ako odkaz na to, čo sa testuje.

▼M7

Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií OSN (ďalej len „GHS OSN“): systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a miery fyzického, zdravotného a environmentálneho nebezpečenstva a označovania pomocou príslušných komunikačných prvkov, ako sú piktogramy, signalizačné výrazy, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, ktoré obsahujú informácie o ich škodlivých účinkoch z hľadiska ochrany ľudí (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a záchranných zložiek) a životného prostredia (1).

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

Validná testovacia metóda: testovacia metóda, ktorá sa na daný účel považuje za dostatočne relevantnú a spoľahlivú a ktorá je založená na vedecky podložených zásadách. Testovacia metóda nie je nikdy platná v absolútnom zmysle, ale len vo vzťahu k vymedzenému účelu (29).

▼M7

Dodatok 2

CHEMIKÁLIE NA PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

Kožná senzibilizácia *in vitro*: testovacia metóda „ARE-Nrf2 luciferáza“

Pred rutinným použitím tejto testovacej metódy by mali laboratóriá preukázať technickú spôsobilosť tým, že správne získajú očakávanú prognózu výsledku skúšky KeratinoSens™ v prípade 10 chemikálií na preukázanie spôsobilosti odporúčaných v tabuľke 1 a získaním hodnôt $EC_{1,5}$ a IC_{50}, ktoré spadajú do príslušného referenčného rozsahu pre najmenej 8 z 10 látok na preukázanie spôsobilosti. Tieto látky na preukázanie spôsobilosti boli vybrané tak, aby reprezentovali rozsah reakcií na nebezpečenstvo kožnej senzibilizácie. Ďalším kritériom výberu bola komerčná dostupnosť, dostupnosť kvalitnej referenčnej vzorky *in vivo* a kvalitných údajov *in vitro* zo skúšky KeratinoSens™.

Tabuľka 1

Odporúčané chemikálie na preukazovanie technickej spôsobilosti pri skúške KeratinoSens™

Chemikálie na preukázanie spôsobilosti	CASRN	Fyzikálna forma	Prognóza *in vivo* [1]	KeratinoSens™ Prognóza [2]	$EC_{1.5}$ (μM) referenčné pásmo [3]	IC_{50} (μM) referenčné pásmo [3]
izopropanol	67-63-0	v kvapalnej forme	nespôsobuje senzibilizáciu	negatívna	> 1 000	> 1 000
kyselina salicylová	69-72-7	v tuhej forme	nespôsobuje senzibilizáciu	negatívna	> 1 000	> 1 000
kyselina mliečna	50-21-5	v kvapalnej forme	nespôsobuje senzibilizáciu	negatívna	> 1 000	1000
glycerol	56-81-5	v kvapalnej forme	nespôsobuje senzibilizáciu	negatívna	> 1 000	> 1 000
(*E*)-3-fenylprop-2-én-1-ol	104-54-1	v tuhej forme	senzibilizátor (slabý)	pozitívna	25 – 175	> 1 000
etylénglykol-dimetakrylát	97-90-5	v kvapalnej forme	senzibilizátor (slabý)	pozitívna	5 – 125	> 500
benzotiazol-2-tiol	149-30-4	v tuhej forme	senzibilizátor (mierny)	pozitívna	25 – 250	> 500
2-bróm-2-(brómmetyl)pentándinitril	35691-65-7	v tuhej forme	senzibilizátor (silný)	pozitívna	< 20	20 – 100
bis(4-hydroxy-*N*-metylanilínium)-sulfát	55-55-0	v tuhej forme	senzibilizátor (silný)	pozitívna	< 12,5	20 – 200
1-chlór-2,4-dinitrobenzén	97-00-7	v tuhej forme	senzibilizátor (extrémny)	pozitívna	< 12,5	5 – 20

([1]) Prognózy nebezpečnosti (a potencie) *in vivo* vychádzajú z údajov LLNA (13). Potencia *in vivo* je odvodená pomocou kritérií navrhnutých ECETOC (24).
([2]) Prognóza KeratinoSens™ by sa mala posudzovať v rámci IATA a v súlade s ustanoveniami bodov 9 a 11 tejto testovacej metódy.
([3]) Na základe hodnôt pozorovaných v minulosti (12).

▼**M7**

Dodatok 3

KONTROLA KVALITY MERANÍ LUMINISCENCIE

Základný pokus na zaručenie optimálnych meraní luminiscencie pri skúške KeratinoSens™

Na získanie spoľahlivých výsledkov z luminometra sú kľúčové tieto tri faktory:

— dostatočná citlivosť poskytujúca stabilné pozadie v kontrolných jamkách;

— bez gradientu na platničke z dôvodu dlhého odčítavania a

— žiadna svetelná kontaminácia susedných jamiek spôsobená silne aktívnymi jamkami.

Pred testom sa odporúča overiť zloženie kontrolnej štruktúry platničky spôsobom opísaným nižšie (trojnásobnou analýzou), aby sa zaručila primeranosť meraní luminiscencie.

Zloženie štruktúry platničky pri prvom cvičnom pokuse

	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**	**slepá**

EGDMA = etylénglykol-dimetakrylát (CAS č.: 97-90-5) je silne induktívna chemikália

CA = aldehyd kyseliny škoricovej, pozitívna referenčná vzorka (CAS č.: 104-55-2)

Analýza kontroly kvality by mala preukázať:

— jednoznačný vzťah medzi dávkou a reakciou v riadku D, s hodnotou I_{max} > 20-násobok nad pozadím (vo väčšine prípadov sa dosahujú hodnoty I_{max} v rozmedzí od 100 do 300);

— žiadny vzťah medzi dávkou a reakciou v riadkoch C a E (žiadna z hodnôt indukcie nepresahuje 1,5; ideálne nie viac ako 1,3) vzhľadom na možnú svetelnú kontamináciu, najmä v blízkosti veľmi aktívnych jamiek v riadku EGDMA;

— žiaden štatisticky významný rozdiel medzi riadkami A, B, C, E, F a G. (t. j. žiadne bez gradientu na platničke) a

— variabilita v ktoromkoľvek z riadkov A, B, C, E, F a G a v jamkách s DMSO v riadku H by mala byť nižšia ako 20 % (t. j. stabilné pozadie).

▼M7

B.61. TESTOVACIA METÓDA ÚNIKU FLUORESCEÍNU NA ZISŤOVANIE OČNÝCH ŽIERAVÍN A SILNE DRÁŽDIVÝCH LÁTOK

ÚVOD

Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 460 (2012). Testovacia metóda úniku fluoresceínu (*Fluorescein Leakage* – FL) je testovacia metóda *in vitro*, ktorú je za určitých okolností možné a pri určitých obmedzeniach použiť na klasifikáciu chemikálií (látok a zmesí) ako očných žieravín a silne dráždivých látok tak, ako sú definované v Globálnom harmonizovanom systéme klasifikácie a označovania chemikálií (GHS) Organizácie spojených národov (OSN) (kategória 1), v nariadení (ES) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (CLP) ([1]) (kategória 1) a Agentúrou na ochranu životného prostredia USA (EPA) (kategória I) (1) (2). Na účely tejto testovacej metódy sa za silne dráždivé látky považujú chemikálie spôsobujúce po podaní testovanej chemikálie poškodenie očného tkaniva, ktoré je do 21 dní nezvratné, alebo spôsobujúce vážne fyzické zhoršenie zraku, pričom očné žieraviny sú chemikálie, ktoré spôsobujú nezvratné poškodenie očného tkaniva. Tieto chemikálie sú klasifikované GHS OSN v kategórii 1, CLP EÚ v kategórii 1 alebo EPA USA v kategórii I.

Zatiaľ čo testovacia metóda FL sa nepovažuje za validnú a plnohodnotnú náhradu testu očí králikov *in vivo*, odporúča sa používať ako súčasť stratégie viacúrovňového testovania na účely klasifikácie a označovania regulačnými orgánmi. Preto sa FL odporúča ako prvý krok v rámci prístupu zhora nadol na zisťovanie očných žieravín/silne dráždivých látok, konkrétne v prípade obmedzených druhov chemikálií (*t. j.* látok a zmesí, ktoré sú rozpustné vo vode) (3) (4).

V súčasnosti je všeobecne akceptovaný fakt, že v blízkej budúcnosti nebude existovať žiaden test podráždenia očí *in vitro*, ktorým by bolo možné nahradiť očný test *in vivo* [TM B.5 (5)] umožňujúci prognózy naprieč celým spektrom dráždivosti v rámci jednotlivých chemických tried. Je však možné, že strategické kombinácie viacerých alternatívnych testovacích metód v rámci (viacúrovňovej) stratégie testovania dokážu očný test *in vivo* nahradiť (4). Prístup zhora nadol (4) je navrhnutý tak, aby sa použil vo chvíli, keď je možné (na základe dostupných informácií) predpokladať, že daná chemikália bude mať vysokodráždivý potenciál.

Na základe modelu prognózy podrobne opísaného v bode 35 dokáže testovacia metóda FL identifikovať chemikálie v určitej sfére použitia ako očné žieraviny/silne dráždivé látky (GHS OSN kategória 1; CLP EÚ, kategória 1; US EPA kategória I) bez ďalšieho testovania. To isté sa predpokladá v prípade zmesí, hoci zmesi neboli pri validácii použité. Preto je možné testovaciu metódu FL použiť na zistenie podráždenia očí/žieravosti chemikálií po tom, čo sa realizovala stratégia postupného testovania v rámci testovacej metódy B.5 (5). Chemikáliu, ktorá nemá prognózu očnej žeriaviny alebo silne dráždivej látky pri testovacej

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006 (Ú. v. EÚ L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼M7

metóde FL, však bude potrebné podrobiť testu jednou alebo viacerými dodatočnými testovacími metódami (*in vitro* a/alebo *in vivo*), ktoré sú schopné presne určiť i) chemikálie, ktoré sú ako očné žieraviny/silne dráždivé látky pri metóde FL falošne negatívne *in vitro* (GHS OSN kategória 1; CLP EÚ, kategória 1; US EPA kategória I); ii) chemikálie, ktoré nie sú klasifikované ako žieravé/dráždivé pre oči (GHS OSN bez kategórie; CLP EÚ bez kategórie; US EPA kategória IV); a/alebo iii) chemikálie, ktoré sú mierne/slabo dráždivé pre oči (GHS OSN kategórie 2A a 2B; CLP EÚ, kategória 2; US EPA kategórie II a III).

Účelom tejto metódy je opísať postupy hodnotenia potenciálnej očnej žieravosti alebo silnej dráždivosti testovanej chemikálie, ktorá sa meria jej schopnosťou spôsobiť poškodenie nepriepustnej súvislej monovrstvy epitelu. Integrita medziepitelovej priepustnosti je základnou funkciou epitelov, ktoré nájdeme napríklad v spojivke a rohovke. Medziepitelovú priepustnosť kontroluje niekoľko tesných spojov (*zonula occludens*). Ukázalo sa, že zvyšovanie priepustnosti epitelu rohovky *in vivo* súvisí s rozsahom zápalu a poškodenia povrchu, ku ktorým dochádza narastajúcim podráždením očí.

V testovacej metóde FL sa toxické účinky po krátkodobej expozícii testovanej chemikálii merajú zvýšením priepustnosti nátrium-fluoresceínu cez monovrstvu epitelu Madinových-Darbyho buniek v psích obličkách (MDCK) kultivovaných na priepustných inzertoch. Pozorované množstvo úniku fluoresceínu je úmerné miere chemicky vyvolaného poškodenia tesných spojov, desmozomálnych spojov a bunkových membrán a môže sa použiť na odhad potenciálnej očnej toxicity testovanej chemikálie. V dodatku 1 je obrázok MDCK buniek pestovaných na inzertnej membráne na účely testovacej metódy FL.

Definície sú uvedené v dodatku 2.

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

Táto testovacia metóda vychádza z protokolu INVITTOX č. 71 (6), ktorý bol hodnotený prostredníctvom medzinárodnej validačnej štúdii realizovanej Európskym centrom pre validáciu alternatívnych metód (ECVAM), v spolupráci s americkým Medziagentúrnym koordinačným výborom pre validáciu alternatívnych metód (ICCVAM) a japonským Centrom pre validáciu alternatívnych metód (JaCVAM).

Testovacia metóda FL sa neodporúča na identifikáciu chemikálií, ktoré by sa mali klasifikovať ako slabé/mierne dráždivé alebo chemikálií (látok a zmesí), ktoré by nemali byť klasifikované v kategórii očná dráždivosť (t. j. GHS OSN kategória 2A/2B, resp. bez kategórie; CLP EÚ kategória 2, resp. bez kategórie; US EPA kategórie II/III/IV), ako to vyplýva z validačnej štúdie (3) (7).

Táto testovacia metóda sa používa iba v prípade chemikálií (látok a zmesí) rozpustných vo vode. Použitím testovacej metódy FL je možné vo všeobecnosti správne predpovedať potenciál spôsobovať vážne podráždenie očí v prípade chemikálií rozpustných vo vode a/alebo ak toxický účinok nie je ovplyvnený riedením (7). Aby bolo možné charakterizovať chemikáliu ako vo vode rozpustnú v experimentálnych podmienkach, mala by byť rozpustná v sterilnom Hanksovom vyváženom soľnom roztoku (HBSS) s koncentráciou ≥ 250 mg/ml (jedna dávka nad hraničnú hodnotu 100 mg/ml), s obsahom vápnika (pri koncentrácii 1,0 – 1,8 mM) a bez fenolovej červene. Ak je však chemikália rozpustná pri koncentrácii pod 100 mg/ml a pri tejto koncentrácii už spôsobuje 20 % indukciu FL (t. j. FL_{20} < 100 mg/ml), možno ju stále klasifikovať ako chemikáliu GHS OSN kategórie 1 alebo US EPA kategórie I.

Zistené obmedzenia tejto testovacej metódy vylučujú zo sféry jej použitia silné kyseliny a zásady, bunkové fixatíva a vysokoprchavé chemikálie. Tieto chemikálie majú mechanizmy, ktoré sa nemerajú testovacou metódou FL, napr. rozsiahla koagulácia, zmydelnenie alebo špecifické mechanizmy chemickej reaktívnosti. Ostatné zistené obmedzenia tejto testovacej metódy vychádzajú z výsledkov prognostických možností v prípade farebných a viskóznych testovaných chemikálií (7). Predpokladá sa, že oba typy chemikálií sa po krátkodobej expozícii len ťažko odstraňujú z monovrstvy a že prognózy výsledkov tejto

▼M7

testovacej metódy možno vylepšiť zvýšeným počtom použitých cyklov umývania. Chemikálie v tuhej forme rovnomerne rozptýlené v kvapaline majú tendenciu sa vyzrážať, a preto môže byť ťažké stanoviť konečnú koncentráciu v bunkách. Keď sa chemikálie týchto chemických a fyzikálnych tried z databázy vylúčia, presnosť testovacej metódy FL v rámci klasifikačných systémov EÚ, US EPA a GHS OSN sa podstatne zlepší (7).

Vzhľadom na účel tejto testovacej metódy (ktorým je identifikovať očné žieraviny/silne dráždivé látky) nie sú miery falošnej negativity (pozri bod 13) rozhodujúce, keďže tieto chemikálie by sa (v závislosti od požiadaviek regulačných orgánov) následne podrobili iným primerane validovaným testom *in vitro* alebo testom na králikoch použitím stratégie postupného testovania s prihliadnutím na závažnosť dôkazov (5) (pozri tiež body 3 a 4).

Ostatné zistené obmedzenia testovacej metódy FL sú založené na miere falošných negatívnych a falošne pozitívnych výsledkov. Ak sa použije ako prvý krok v rámci prístupu zhora nadol s cieľom identifikovať vo vode rozpustné očné žieraviny/silne dráždivé látky a zmesi (GHS OSN kategória 1; CLP EÚ, kategória 1; US EPA kategória I), miera falošnej pozitivity sa v prípade testovacej metódy FL pohybovala od 7 % (7/103; GHS OSN a CLP EÚ) do 9 % (9/99; US EPA) a miera falošnej negativity od 54 % (15/28; US EPA) do 56 % (27/48; GHS OSN a CLP EÚ) v porovnaní s výsledkami *in vivo*. Chemické skupiny vykazujúce falošné pozitívne a/alebo falošné negatívne výsledky pri testovacej metóde FL tu nie sú definované.

Určité technické obmedzenia sú špecifické pre kultúru MDCK buniek. Tesné spoje, ktoré blokujú prechod nátrium-fluoresceinového farbiva monovrstvou, sú čoraz viac oslabované rastúcim počtom bunkových pasáží. Neúplné usporiadanie tesných spojov vedie k zvýšeniu FL v neovplyvnenej kontrole. Preto je dôležité stanoviť najvyššiu prípustnú mieru úniku v neovplyvnených kontrolách (pozri bod 38: 0 % úniku). Pri všetkých testoch *in vitro* existuje možnosť, že časom dôjde k transformácií buniek, a preto je nevyhnutné stanoviť pri týchto skúškach rozsah počtu pasáží.

Existujúce sféry použiteľnosti možno v niektorých prípadoch rozšíriť, ale až po analýze rozšíreného súboru údajov o skúmaných testovaných chemikáliách, najlepšie získaného testovaním (3). Táto testovacia metóda sa bude zodpovedajúcim spôsobom aktualizovať, keďže sa posudzujú nové informácie a údaje.

V každom laboratóriu, ktoré prvýkrát túto skúšku zavádza, by sa mali použiť chemikálie na preukázanie spôsobilosti uvedené v dodatku 3. Laboratóriá môžu tieto chemikálie použiť na preukázanie svojej technickej spôsobilosti vykonávať testovaciu metódu FL na účely klasifikácie nebezpečenstva podľa právnych predpisov.

PRINCÍP TESTU

Testovacia metóda FL je skúška *in vitro* založená na cytotoxicite a funkcii buniek, ktorá sa vykonáva na súvislej monovsrtve trubicovitých epitelových buniek MDCK CB997 pestovaných na polopriepustných inzertoch a predstavujúcich model stavu epitelu rohovky *in vivo* bez rozmnožovania. Bunková línia MDCK je stabilná a vytvára tesné a desmozomálne spoje podobné tým, ktoré nájdeme na apikálnej strane epitelov spojivky a rohovky. Tesné a desmozomálne spoje *in vivo* zabraňujú prenikaniu rozpustených látok a cudzorodých materiálov do epitelu rohovky. Strata medziepitelovej nepriepustnosti z dôvodu poškodenia tesných a desmozomálnych spojov je jedným z prvých príznakov chemicky vyvolaného podráždenia očí.

▼M7

Testovaná chemikália sa aplikuje na súvislú vrstvu buniek pestovaných na apikálnej strane inzertu. Obyčajne sa použije krátka, minútová expozícia, aby sa zohľadnila bežná miera klírensu v prípade ľudskej expozície. Výhodou krátkej expozície je, že látky na báze vody a zmesi je možné testovať čisté, ak sa po expozícii dajú ľahko odstrániť. To umožní priamejšie porovnanie výsledkov s chemickými účinkami na ľudí. Testovaná chemikália sa potom odstráni a netoxické, vysoko fluorescenčné nátrium-fluoresceínové farbivo sa na 30 minút pridá na apikálnu stranu monovrstvy. Poškodenie tesných spojov spôsobené testovanou chemikáliou sa určí podľa množstva fluoresceínu, ktorý unikne vrstvou buniek za určitý vopred stanovený čas.

Množstvo nátrium-fluoresceínového farbiva, ktoré prenikne monovrstvou a inzertnou membránou do fixného objemu roztoku v jamke (s únikom nátrium-fluoresceínového farbiva), sa určí spektrofluorometrickým meraním koncentrácie fluoresceínu v jamke. Množstvo uniknutého fluoresceínu (FL) sa vypočíta podľa údajov fluorescenčnej intenzity (FI) odčítaných z dvoch kontrol: zo slepej kontroly a z kontroly s maximálnym únikom. V porovnaní s týmito kontrolami sa potom pre každý súbor koncentrácií testovanej chemikálie vyjadrí percento úniku, a teda rozsah poškodenia. Následne sa vypočíta hodnota FL_{20} (t. j. koncentrácia, ktorá spôsobí 20 % úniku fluoresceínu v porovnaní s hodnotami zaznamenanými na neovplyvnenej súvislej monovrstve a inzertoch bez buniek). Hodnota FL_{20} (v mg/ml) sa použije v prognostickom modeli na zisťovanie očných žieravín a silne dráždivých látok (pozri bod 35).

Obnoviteľnosť je významnou súčasťou profilu toxicity testovanej chemikálie a takisto sa posudzuje testom podráždenia očí *in vivo*. Z predbežných analýz vyplynulo, že údaje o obnoviteľnosti (do 72 hodín po expozícii účinkom chemikálie) by mohli zvýšiť prognostický potenciál protokolu 71 INVITTOX, je však potrebné vykonať ďalšie hodnotenie a získať dodatočné údaje, najlepšie ďalším testovaním (6). Táto testovacia metóda sa bude zodpovedajúcim spôsobom aktualizovať, keďže sa posudzujú nové informácie a údaje.

POSTUP

Príprava bunkovej monovrstvy

Monovrstva zložená z buniek MDCK CB997 sa pripraví použitím subkonfluentných buniek pestovaných v kultivačných bankách s DMEM/zmes živín F12 (1x koncentrát s L-glutamínom, 15 mM HEPES, vápnik (v koncentrácii 1,0 – 1,8 mM) a 10 % tepelne inaktivovaný FCS, FBS). Je dôležité poznamenať, že všetky médiá/roztoky používané počas skúšky FL by mali obsahovať vápnik v koncentrácii medzi 1,8 mM (200 mg/l) a 1,0 mM (111 mg/l), aby sa zaručila tvorba a celistvosť tesných spojov. Rozsah počtu bunkových pasáží by sa mal kontrolovať, aby sa zaručila rovnomerná a reprodukovateľná tvorba tesných spojov. Odporúča sa, aby boli bunky v rozmedzí od 3 do 30 pasážovaní po rozmrazení, pretože bunky v tomto rozmedzí pasážovania majú podobnú funkčnosť, čo zvyšuje reprodukovateľnosť výsledkov skúšky.

Pred vykonaním testovacej metódy FL sa bunky oddelia od banky trypsinizáciou, centrifugujú sa a primeraný počet buniek sa nasadí do inzertov umiestnených v platničkách s 24 jamkami (pozri dodatok 1). K nasadeniu buniek by sa mali použiť inzerty s priemerom dvanásť mm, s membránou zo zmesi esterov celulózy, s hrúbkou 80 – 150 μm a veľkosťou pórov 0,45 μm. Pri validačnej štúdii boli použité inzerty Millicell-HA 12 mm. Vlastnosti typu inzertu a membrány sú dôležité, pretože môžu ovplyvniť rast buniek a chemické väzby. Určité typy chemikálií sa môžu viazať na inzertnú membránu Millicell-HA, čo môže ovplyvniť interpretáciu výsledkov. Ak sa použijú iné membrány, mali by sa na preukázanie ich rovnocennosti použiť chemikálie na preukázanie spôsobilosti (pozri dodatok 3).

▼M7

Chemické väzby na inzertnú membránu sú bežnejšie v prípade katiónových chemikálií, ako napr. benzalkónium-chlorid, ktoré sú priťahované k nabitej membráne (7). Chemické väzby na inzertnú membránu môže zvyšovať čas chemickej expozície a spôsobiť nadhodnotenie toxického potenciálu chemikálie, no zároveň môžu fyzicky znížiť únik fluoresceínu cez inzert naviazaním farbiva na katiónovú chemikáliu spojenú s inzertnou membránou, čo spôsobí podhodnotenie toxického potenciálu chemikálie. To sa dá ľahko monitorovať vystavením samotnej membrány najvyššej koncentrácii testovanej chemikálie a následne pridaním farbiva s obsahom fluoresceínu sodného pri bežnej koncentrácii na štandardný čas (kontrola bez buniek). Ak dôjde k naviazaniu nátrium-fluoresceínového farbiva, inzertná membrána sa po zmytí testovaného materiálu javí ako žltá. Preto je nevyhnutné poznať väzobné vlastnosti testovanej chemikálie, aby bolo možné interpretovať vplyv chemikálie na bunky.

Nasadením buniek do inzertov by sa počas chemickej expozície mala vytvoriť súvislá monovrstva. Do každého inzertu by sa malo pridať $1{,}6 \times 10^5$ buniek (400 µl bunkovej suspenzie s hustotou 4×10^5 buniek/ml). Za týchto podmienok sa súvislá monovrstva v kultúre obyčajne vytvorí po 96 hodinách. Inzerty by sa mali pred nasadením vizuálne skontrolovať tak, aby sa zaručilo, že akékoľvek poškodenie zaznamenané pri vizuálnej kontrole uvedenej v bode 30 bolo spôsobené manipuláciou.

Bunkové kultúry MDCK by sa mali uchovávať v inkubátoroch vo zvlhčovanej atmosfére pri 5 % ± 1 % CO_2 a 37 ± 1 °C. Bunky by nemali byť kontaminované baktériami, vírusmi, mykoplazmami ani hubami.

Aplikácia testovaných a kontrolných chemikálií

Pre každú pokusnú skúšku je potrebné pripraviť nový zásobný roztok testovanej chemikálie a použiť ho do 30 minút od prípravy. Testované chemikálie by sa mali pripravovať v HBSS s obsahom vápnika (pri koncentrácii 1,0 – 1,8 mM) a bez fenolovej červene, aby sa zabránilo väzbe proteínov zo séra. Pred testom by sa mala skontrolovať rozpustnosť chemikálie pri 250 mg/ml v HBSS. Ak pri tejto koncentrácii vytvorí chemikália do 30 minút stabilnú suspenziu alebo emulziu (*t. j.* zostane jednotvárna a neusadí sa ani neoddelí do viac ako jednej fázy), je možné aj naďalej použiť HBSS ako rozpúšťadlo. Ak sa však chemikália pri tejto koncentrácii v HBSS nerozpustí, malo by sa zvážiť použitie iných testovacích metód ako FL. Použitie ľahkého minerálneho oleja ako rozpúšťadla v prípadoch, že sa chemikália v HBSS nerozpustí, by sa malo posudzovať s rezervou, keďže nie je k dispozícii dostatok údajov zaručujúcich výkonnosť skúšky FL v týchto podmienkach.

Všetky chemikálie, ktoré sa majú testovať, sa pripravia zo zásobného roztoku v sterilnom HBSS s obsahom vápnika (pri koncentrácii 1,0 – 1,8 mM) a bez fenolovej červene pri piatich fixných hmotnostných koncentráciách: 1, 25, 100,250 mg/ml ako čistý alebo nasýtený roztok. Pri testovaní chemikálií v tuhej forme by sa mala doplniť aj veľmi vysoká koncentrácia 750 mg/ml. Chemikália s touto koncentráciou sa môže aplikovať na bunky pipetou s priamym posunutím. Ak sa zistí toxicita v rozmedzí od 25 do 100 mg/ml, mali by sa dvakrát otestovať tieto dodatočné koncentrácie: 1, 25, 50, 75 a 100 mg/ml. Hodnota FL_{20} sa odvodí z týchto koncentrácií za predpokladu, že boli splnené kritériá prijateľnosti.

Testované chemikálie sa aplikujú na súvislé monovrstvy buniek po odstránení kultivačného bunkového média a dvojnásobnom premytí sterilným, teplým (37 °C) HBSS s obsahom vápnika (pri koncentrácii 1,0 – 1,8 mM) a bez fenolovej červene. Predtým sa vizuálne skontrolovali filtre, aby sa zistili už existujúce poškodenia, ktoré by mohli byť nesprávne pripísané možnej nezlučiteľnosti s testovanými chemikáliami. Pri každom pokuse by sa pri každej

▼M7

koncentrácii testovanej chemikálie a kontrol mali použiť aspoň tri replikáty. Po expozícii trvajúcej 1 minútu pri izbovej teplote by sa testovaná chemikália mala opatrne odstrániť odsatím, monovrstva by sa mala dvakrát premyť sterilným, teplým (37 °C) HBSS s obsahom vápnika (pri koncentrácii 1,0 – 1,8 mM) a bez fenolovej červene a ihneď potom sa zmeria únik fluoresceínu.

Pri každom pokuse by sa mali súbežne použiť negatívne (NK) a pozitívne kontroly (PK), aby sa preukázalo, že celistvosť monovrstvy (NK) a citlivosť buniek (PK) sú v rámci stanoveného historického rozpätia prijateľnosti. Chemikália navrhovaná ako PK je Brij 35 (CAS č. 9002-92-0) pri 100 mg/ml. Táto koncentrácia by mala spôsobiť približne 30 % únik fluoresceínu (prijateľný rozsah úniku fluoresceínu 20 – 40 %, t. j. poškodenie bunkovej vrstvy). Chemikália navrhovaná ako NK je HBSS (neovplyvnená, slepá kontrola) s obsahom vápnika (pri koncentrácii 1,0 – 1,8 mM) a bez fenolovej červene. Súčasťou každého pokusu by mala byť aj kontrola s maximálnym únikom, aby bolo možné vypočítať hodnoty FL_{20}. Maximálny únik sa stanoví pomocou kontrolného inzertu bez buniek.

Stanovenie priepustnosti fluoresceínu

Ihneď po odstránení testovaných a kontrolných chemikálií sa do inzertov (napr. Millicell-HA) pridá 400 µl z 0,1 mg/ml roztoku nátrium-fluoresceínu [0,01 hm. % HBSS s obsahom vápnika (pri koncentrácii 1,0 – 1,8 mM) a bez fenolovej červene]. Kultúry sa nechajú odstáť 30 minút pri izbovej teplote. Na konci inkubácie fluoresceínom sa inzerty opatrne vyberú z každej jamky. Vykoná sa vizuálna kontrola všetkých filtrov a zaznamená sa každé poškodenie, ku ktorému mohlo dôjsť pri manipulácii.

V roztoku, ktorý zostal v jamkách po odstránení inzertov, sa vyčísli množstvo fluoresceínu, ktoré uniklo cez monovrstvu a inzert. Spektrofluorimetrom sa vykonajú merania pri excitačnej vlnovej dĺžke 485 nm a emisnej vlnovej dĺžke 530 nm. Citlivosť spektrofluorimetra by sa mala nastaviť tak, aby bol čo najvyšší číselný rozdiel medzi maximálnym FL (inzert bez buniek) a minimálnym FL (inzert so súvislou monovrstvou upravenou NK). Vzhľadom na rozdiely v používaných spektrofluorimetroch sa navrhuje, aby sa použila citlivosť, ktorá poskytne intenzitu fluorescencie > 4 000 pri kontrole s maximálnym únikom fluoresceínu. Maximálna hodnota FL by nemala byť vyššia ako 9 999. Maximálna intenzita úniku fluorescencie by mala byť v lineárnom rozsahu použitého spektrofluorimetra.

Interpretácia výsledkov a model prognózy

Množstvo FL je úmerné chemicky vyvolanému poškodeniu tesných spojov. Percento FL pri každej testovanej koncentrácii chemikálie sa vypočíta z hodnôt FL získaných v prípade danej testovanej chemikálie s prihliadnutím na hodnoty FL z NK (odčítané zo súvislej monovrstvy buniek upravenej NK) a kontroly s maximálnym únikom (odčítané ako množstvo FL cez inzert bez buniek).

Priemerná maximálna intenzita úniku fluorescencie = x

Priemerná 0 % intenzita úniku fluorescencie (NK) = y

Priemerný 100 % únik sa získa odpočítaním priemerného 0 % úniku od priemerného maximálneho úniku,

t. j. x – y = z

Percento úniku pre každej fixnej dávke sa získa odpočítaním 0 % úniku od priemernej intenzity fluorescencie z troch meraných replikátov (m) a vydelením tejto hodnoty 100 % únikom, *t. j.* % FL = [(m – y)/z] × 100 %, kde:

▼M7

m = priemerná intenzita fluorescencie z troch replikačných meraní pri danej koncentrácii

% FL = percento fluoresceínu, ktoré unikne cez bunkovú vrstvu

Na výpočet chemickej koncentrácie spôsobujúcej 20 % FL by sa mala použiť táto rovnica:

$$FL_D = [(A - B)/(C - B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

kde:

D = percento inhibície

A = % poškodenia (20 % únik fluoresceínu)

B = % úniku fluoresceínu < A

B = % úniku fluoresceínu > A

M_C = koncentrácia (v mg/ml) pre C

M_B = koncentrácia (v mg/ml) pre B

Hraničná hodnota FL_{20} na predpovedanie správania chemikálií ako očných žieravín/silne dráždivých látok je:

FL_{20} (v mg/ml)	GHS OSN C&L	EÚ CLP C&L	US EPA C&L
≤ 100	kategória 1	kategória 1	kategória I

C&L: klasifikácia a označovanie

Testovacia metóda FL sa odporúča len na účely identifikácie vo vode rozpustných očných žieravín a silne dráždivých látok (GHS OSN kategória 1, EÚ CLP kategória 1 a US EPA kategória I) (pozri body 1 a 10).

Aby bolo možné identifikovať vo vode rozpustné chemikálie (látky a zmesi) (3) (6) (7) ako „spôsobujúce vážne poškodenie očí“ (GHS OSN/EÚ CLP kategória 1) alebo ako „očná žieravina alebo silne dráždivá látka“ (US EPA kategória I), testovaná chemikália by mala vykazovať hodnotu $FL_{20} \leq 100$ mg/ml.

Prijateľnosť výsledkov

Priemerná maximálna hodnota úniku fluoresceínu (x) by mala byť vyššia ako 4 000 (pozri bod 31), priemerný 0 % únik (y) by mal byť ≤ 300 a priemerná hodnota 100 % úniku (z) by mala byť medzi 3 700 a 6 000.

Test sa považuje za prijateľný, ak pozitívna kontrola spôsobila 20 % až 40 % poškodenie bunkovej vrstvy (merané ako % úniku fluoresceínu).

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje

Pri každom pokuse by sa mali do tabuľky zapísať údaje z jednotlivých jamiek s replikátmi (napr. hodnoty intenzity fluorescencie a vypočítané percentuálne hodnoty FL pre každú testovanú chemikáliu vrátane klasifikácie). Okrem toho je potrebné pri každom pokuse zaznamenať v prípade každého merania replikátov aj priemerné hodnoty ± štandardné odchýlky.

▼M7

Skúšobný protokol

Skúšobný protokol by mal obsahovať tieto informácie:

Testované a kontrolné chemikálie

— Názov chemikálie (chemikálií), ako je štrukturálny názov, ktorý používa služba Chemical Abstracts Service (ďalej len 'CAS'), po ktorom nasledujú iné názvy, ak sú známe;

— číslo CAS chemikálie, ak je známe;

— čistota a zloženie látky alebo zmesi (v hmotnostných percentách), pokiaľ je táto informácia k dispozícii;

— fyzikálno-chemické vlastnosti relevantné na vykonanie štúdie (napr. fyzikálny stav, prchavosť, pH, stabilita, rozpustnosť vo vode, chemická trieda);

— prípadná úprava testovaných/kontrolných chemikálií pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie);

— podmienky skladovania.

Zdôvodnenie testovacej metódy a použitý protokol

— Sem by mali zahrnuté úvahy o sfére použiteľnosti a obmedzeniach testovacej metódy.

Podmienky testu

— Opis použitého systému buniek vrátane osvedčenia o pravosti a stave mykoplazmy bunkovej línie;

— podrobnosti o použitom testovacom postupe;

— použitá koncentrácia (koncentrácie) testovanej látky;

— dĺžka expozície účinkom testovanej chemikálie;

— dĺžka inkubácie fluoresceínom;

— opis všetkých modifikácií testovacieho postupu,

— opis použitých hodnotiacich kritérií.

— odkaz na historické údaje daného modelu (napr. negatívne a pozitívne kontroly, referenčné chemikálie, ak existujú);

— informácie o technickej spôsobilosti preukázanej laboratóriom.

Výsledky

— Uvedenie údajov týkajúcich sa individuálnych testovaných chemikálií a kontrol pri každom pokuse a meraní každého replikátu (vrátane individuálnych výsledkov, priemerných hodnôt a štatistických odchýlok);

— odvodená klasifikácia, resp. klasifikácie s prihliadnutím na použitý model prognózy a/alebo rozhodovacie kritériá;

— opis ďalších pozorovaných účinkov.

▼**M7**

Diskusia o výsledkoch

— Jej súčasťou by mali byť úvahy o nejednoznačných záveroch (bod 35: FL_{20} > 100 mg/ml) a ďalšom testovaní.

Záver

LITERATÚRA

1. Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií OSN (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – GHS), tretie prepracované znenie, OSN (2009), OSN New York a Ženeva. United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. K dispozícii na: [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. Kapitola B.5 tejto prílohy, Akútna žieravosť/dráždivosť pre oči

6. EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). K dispozícii na: [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.

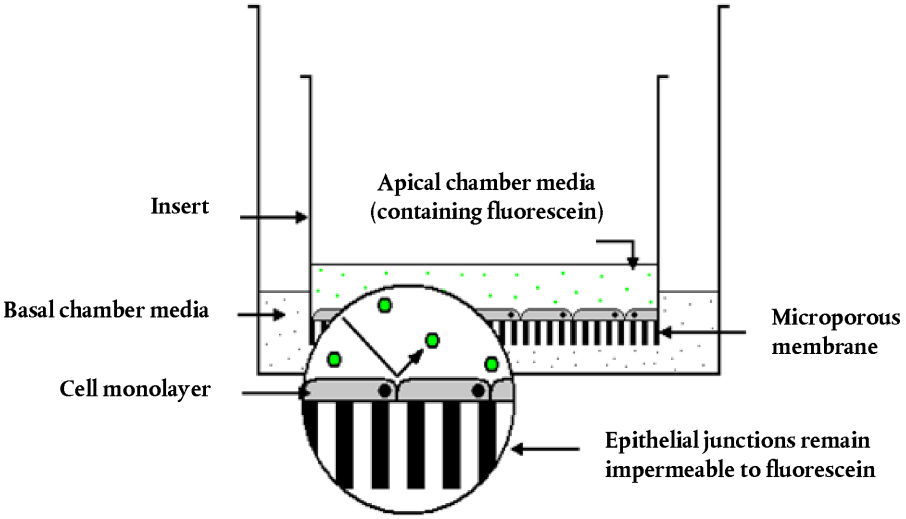
8. OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris.

▼M7

Dodatok 1

ZNÁZORNENIE RASTU MDCK BUNIEK NA INZERTNEJ MEMBRÁNE PRI TESTOVACEJ METÓDE FL

Súvislá vrstva MDCK buniek vytvorená na polopriepustnej membráne inzertu. Inzerty sa umiestnia do jamiek 24-jamkových platničiek.



Obrázok bol prevzatý z: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. dizertačná práca, University of Nottingham, Spojené kráľovstvo.

▼M7

Dodatok 2

DEFINÍCIE

Presnosť: miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Týka sa výkonnosti testovacej metódy a jedného z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy.

Chemikália: látka alebo zmes.

EPA kategória I: chemikálie, ktoré pôsobia ako žieraviny (vyvolávajúce nezvratné poškodenie očného tkaniva), príp. spôsobujú aj postihnutie rohovky alebo podráždenie, ktoré pretrváva viac ako 21 dní (2).

EÚ CLP (nariadenie (ES) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí): zavádza v Európskej únii (EÚ) systém klasifikácie chemikálií (látok a zmesí) GHS OSN.

Miera falošne negatívnych nálezov: podiel všetkých pozitívnych chemikálií, ktoré boli testovacou metódou nesprávne identifikované ako negatívne. Ide o jeden z ukazovateľov výkonnosti testovacej metódy.

Miera falošne pozitívnych nálezov: podiel všetkých negatívnych chemikálií, ktoré boli testovacou metódou nesprávne identifikované ako pozitívne. Ide o jeden z ukazovateľov výkonnosti testovacej metódy.

FL_{20}: hodnota, ktorú možno určiť stanovením koncentrácie, pri ktorej testovaná chemikália spôsobí 20 % únik fluoresceínu cez bunkovú vrstvu.

Únik fluoresceínu: množstvo fluoresceínu merané spektrofluorometriou, ktoré prejde bunkovou vrstvou.

GHS [Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií Organizáciou Spojených národov (OSN)]: systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a miery fyzického, zdravotného a environmentálneho nebezpečenstva a označovania pomocou príslušných komunikačných prvkov, ako sú piktogramy, signalizačné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, ktoré obsahujú informácie o ich škodlivých účinkoch z hľadiska ochrany ľudí (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a záchranných zložiek) a životného prostredia.

GHS kategória 1: po aplikácii testovanej chemikálie na predný okraj oka spôsobí poškodenie tkaniva v oku alebo závažné fyzické zhoršenie zraku, ktoré nie je úplne zvratné do 21 dní po aplikácii.

Nebezpečenstvo (ohrozenie): inherentná vlastnosť činidla, prípadne situácia, ktorá môže vyvolať nepriaznivé účinky pri expozícii organizmu, systému alebo (sub)populácie účinkom daného činidla.

Zmes: v kontexte GHS OSN ako zmes alebo roztok zložený z dvoch alebo viacerých látok, ktoré spolu nereagujú.

Negatívna kontrola: neovplyvnený replikát, ktorý obsahuje všetky zložky testovacieho systému. Táto vzorka sa spracuje vzorkami ovplyvnenými testovanou chemikáliou, ako aj inými kontrolami s cieľom zistiť, či rozpúšťadlo a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

▼M7

Bez klasifikácie: chemikálie, ktoré nie sú klasifikované v kategóriách 1, 2A alebo 2B GHS OSN, kategóriách 1 alebo 2 EÚ CLP EÚ alebo v kategóriách I, II alebo III US EPA ako látky dráždivé pre oči.

Chemikália žieravá pre oči: a) chemikália, ktorá spôsobuje nezvratné poškodenie očného tkaniva; b) chemikálie klasifikované v kategórii 1 GHS OSN, kategórii 1 EÚ CLP alebo v kategórii I US EPA ako látky dráždivé pre oči.

Chemikália dráždivá pre oči: a) chemikália, ktorá po aplikácii na predný okraj oka spôsobí v oku zvratnú zmenu; b) chemikálie klasifikované v kategóriách 2A alebo 2B GHS OSN, kategórii 2 EÚ CLP alebo v kategóriách II alebo III US EPA ako látky dráždivé pre oči.

Chemikália silne dráždivá pre oči: a) chemikália, ktorá po aplikácii na predný okraj oka spôsobí poškodenie očného tkaniva, ktoré je do 21 dní po aplikácii nezvratné, príp. spôsobí závažné fyzické zhoršenie zraku; b) chemikálie klasifikované v kategórii 1 GHS OSN, kategórii 1 EÚ CLP alebo v kategórii I US EPA ako látky dráždivé pre oči.

Pozitívna kontrola: replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému a ovplyvnený chemikáliou, ktorá bezpečne vyvolá pozitívnu odozvu. Aby bolo možné vyhodnotiť variabilitu odozvy na pozitívnu kontrolu v čase, veľkosť pozitívnej reakcie by nemala byť extrémne silná.

Chemikálie na preukázanie spôsobilosti: podsúbor zo zoznamu referenčných chemikálií, ktoré možno použiť na preukázanie spôsobilosti neskúseného laboratória vykonávať validovanú referenčnú testovaciu metódu.

Relevantnosť: opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej test správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testovacej metódy (8).

Spoľahlivosť: meria rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Hodnotí sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a vnútrolaboratórnej opakovateľnosti.

Náhradný test: test navrhnutý ako náhrada za test, ktorý sa bežne používa a je schválený na identifikáciu nebezpečnosti a/alebo hodnotenie rizika a o ktorom sa rozhodlo, že poskytuje rovnakú alebo zvýšenú úroveň ochrany zdravia ľudí alebo zvierat alebo životného prostredia v porovnaní so schváleným testom pre všetky možné testované situácie a chemikálie.

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií správne klasifikovaných testom. Ide o presnosť testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky a musí sa zohľadniť pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (8).

Vážne poškodenie očí: poškodenie očného tkaniva alebo závažné fyzické zhoršenie zraku, ku ktorému dôjde po aplikácii testovanej chemikálie na predný okraj oka, ktoré nie je úplne zvratné do 21 dní po aplikácii.

Kontrola s rozpúšťadlom/nosičom: neovplyvnená vzorka, ktorá obsahuje všetky zložky testovacieho systému vrátane rozpúšťadla alebo nosiča, ktorá sa spracuje ovplyvnenou testovanou chemikáliou a inými kontrolami, aby sa zistila

▼M7

základná odozva vzoriek ovplyvnených testovanou chemikáliou rozpustenou v tom istom rozpúšťadle alebo nosiči. Keď sa táto vzorka testuje so súbežnou negatívnou kontrolou, preukáže sa aj to, či rozpúšťadlo alebo nosič a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií správne klasifikovaných testom. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy.

Látka: v kontexte GHS OSN sa pod látkou rozumejú chemické prvky a ich zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným procesom vrátane všetkých prísad potrebných na zachovanie stálosti výrobku, ako aj všetkých nečistôt vznikajúcich pri použitom procese, ale s vylúčením všetkých rozpúšťadiel, ktoré sa môžu oddeliť bez ovplyvnenia stálosti látky alebo zmeny jej zloženia.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná touto testovacou metódou.

Stratégia viacúrovňového testovania: stratégia postupného testovania, pri ktorej sa všetky existujúce informácie o testovanej chemikálii kontrolujú v určitom poradí analýzou váhy dôkazov na každej z úrovní, pričom sa zisťuje, či je k dispozícii dostatok informácií na rozhodnutie o klasifikácii nebezpečenstva pred prechodom na ďalšiu úroveň. Ak sa dráždivý potenciál testovanej chemikálie môže stanoviť na základe existujúcich informácií, nevyžaduje sa žiadne ďalšie testovanie. Ak dráždivý potenciál testovanej chemikálie nemožno stanoviť na základe existujúcich informácií, vykonáva sa testovanie metódou postupných krokov na zvieratách, až kým sa nedá urobiť jednoznačná klasifikácia.

Validovaná testovacia metóda: testovacia metóda, v súvislosti s ktorou sa ukončili validačné štúdie na stanovenie relevantnosti (vrátane presnosti) a spoľahlivosti pre konkrétny účel. Je dôležité poznamenať, že validovaná testovacia metóda nemusí mať dostatočnú výkonnosť, pokiaľ ide o presnosť a spoľahlivosť, aby bola prijateľná pre navrhovaný účel (8).

Analýza váhy dôkazov: proces posudzovania silných a slabých stránok jednotlivých informácií na dosiahnutie a podporu záveru, ktorý sa týka potenciálu nebezpečnosti danej chemikálie.

▼M7

Dodatok 3

CHEMIKÁLIE NA PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI PRI TESTOVACEJ METÓDE FL

Pred rutinným použitím tejto testovacej metódy by mali laboratóriá preukázať technickú spôsobilosť tým, že správne klasifikujú očnú žieravosť v prípade 8 látok odporúčaných v tabuľke 1. Tieto chemikálie boli vybrané tak, aby reprezentovali rozpätie odoziev na lokálne podráždenie/poleptanie oka, ktoré vychádza z výsledkov *in vivo* testov na očiach králikov [TG 405, TM B.5(5)] (t. j. kategórie 1, 2A, 2B alebo bez klasifikácie podľa GHS OSN). Vzhľadom na validovanú použiteľnosť skúšky FL (t. j. identifikovať výlučne očné žieraviny/silne dráždivé chemikálie) však pri preukazovaní spôsobilosti existujú len dva výsledky testov na účely klasifikácie (je žieravina/silne dráždivá chemikália alebo nie je žieravina/silne dráždivá chemikália). Ďalším kritériom výberu boli parametre ako komerčná dostupnosť chemikálií, dostupnosť kvalitných referenčných údajov *in vivo* a existencia kvalitných údajov z testovacej metódy FL. Z tohto dôvodu boli chemikálie na preukázanie spôsobilosti vybrané z „Revízneho dokumentu o podrobnostiach skúšky úniku fluoresceínu ako alternatívnej metódy testovania na podráždenie očí (*Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing*)“ (8), ktorý bol retrospektívne použitý na validáciu testovacej metódy FL.

Tabuľka 1

Odporúčané chemikálie na preukázanie technickej spôsobilosti pri skúške FL

Chemikália	CAS č.	Chemická trieda (1)	Fyzikálny stav	Klasifikácia *in vivo* (2)	Klasifikácia *in vitro* (3)
benzalkónium-chlorid (5 %)	8001-54-5	óniová zlúčenina	v kvapalnej forme	kategória 1	žieravina/silne dráždivá látka
prometazín, hydrochlorid	58-33-3	amín/amidín, heterocyklický, organická zlúčenina síry	v tuhej forme	kategória 1	žieravina/silne dráždivá látka
hydroxid sodný (10 %)	1310-73-2	zásada	v kvapalnej forme	kategória 1	žieravina/silne dráždivá látka
nátrium-dodecyl-sulfát (15 %)	151-21-3	karboxylová kyselina (soľ)	v kvapalnej forme	kategória 1	žieravina/silne dráždivá látka
4-(karboxy)benzaldehyd	619-66-9	karboxylová kyselina, aldehyd	v tuhej forme	kategória 2(A)	nie je žieravina/silne dráždivá látka
dusičnan amónny	6484-52-2	anorganická soľ	v tuhej forme	kategória 2(A)	nie je žieravina/silne dráždivá látka
etyl-2-metyl-oxobutanoát	609-14-3	ketón, ester	v kvapalnej forme	kategória 2(B)	nie je žieravina/silne dráždivá chemikália
glycerol	56-81-5	alkohol	v kvapalnej forme	bez kategórie	nie je žieravina/silne dráždivá chemikália

Skratky: CAS č. = číslo v registri chemických abstraktov (*Chemical Abstracts Service*).

(1) Chemické triedy boli priradené každej testovanej chemikálii použitím štandardného postupu klasifikácie podľa klasifikačného systému *National Library of Medicine Medical Subject Headings* – MeSH (dostupnom na http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Na základe výsledkov *in vivo* testu na očiach králikov (OECDTG 405, TM B.5) a použitím GHS OSN a EÚ CLP.

(3) Na základe výsledkov zo skúšky FL [protokol INVITTOX č. 71(6)]

▼M7

B.62. ALKALICKÝ KOMÉTOVÝ TEST *IN VIVO* U CICAVCOV

ÚVOD

Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 489 (2016). Alkalický kométový test (jednobunková gélová elektroforéza) *in vivo* (ďalej len „kométový test“) sa používa na zistenie zlomov v reťazcoch DNA buniek alebo jadier izolovaných z viacerých živočíšnych tkanív, prevažne tkanív hlodavcov, ktoré boli vystavené účinkom potenciálne genotoxického materiálu, resp. materiálov. Kométový test bol podrobený revízii a svoje odporúčania k nemu uverejnili viaceré expertné skupiny (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Táto testovacia metóda je súčasťou série testovacích metód týkajúcich sa genetickej toxikológie. Existuje dokument OECD, ktorý poskytuje stručné informácie o testovaní genotoxicity, ako aj prehľad nedávnych zmien, ktoré boli urobené v spomínanom usmernení na vykonávanie testov (11).

Účelom kométového testu je identifikovať chemikálie, ktoré poškodzujú DNA. V alkalickom prostredí (> pH 13) umožňuje kométový test odhaliť jedno- a dvojvláknové zlomy, ktoré sú napr. výsledkom priamych interakcií s DNA, alkalicky labilné miesta alebo následok prechodných zlomov v reťazcoch DNA spôsobených excíznou opravou DNA. Tieto zlomy môžu byť opravené bez trvalých následkov, môžu byť pre bunky smrteľné alebo môžu priamo súvisieť s mutáciou a spôsobiť trvalé zmeny. Zároveň môžu viesť k chromozomálnym poruchám, ktoré súvisia s mnohými ľudskými ochoreniami vrátane rakoviny.

V rokoch 2006 až 2012 prebehol formálny proces validácie kométového testu *in vivo* u hlodavcov, ktorý koordinovalo japonské Centrum pre validáciu alternatívnych metód (JaCVAM) v spojení s Európskym centrom pre validáciu alternatívnych metód (ECVAM), Medziagentúrnym koordinačným výborom pre validáciu alternatívnych metód (ICCVAM) a Medziagentúrnym centrom NTP pre hodnotenie alternatívnych toxikologických metód (NICEATM) (12). Táto testovacia metóda obsahuje odporúčaný spôsob použitia, ako aj obmedzenia kométového testu, pričom vychádza zo záverečného protokolu (12) použitého pri validačnej skúške a z ďalších relevantných uverejnených i neuverejnených (interných laboratórnych) údajov.

Definície kľúčových pojmov sú uvedené v dodatku 1. Je potrebné poznamenať, že na tento test možno použiť mnoho iných platforiem (preparáty, gélové škvrny, 96-jamkové platne atď.). Pre jednoduchosť sa v celom dokumente uvádza pojem „preparát“, zahŕňa však aj všetky ostatné platformy.

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

Kométový test je metóda, ktorou sa merajú zlomy v reťazcoch DNA eukaryotických buniek. Jednotlivé bunky/jadrá vsadené do agarózy na preparáte sa lyzujú čistiacim prostriedkom a vysokou koncentráciou soli. V tejto fáze rozpadu sa bunkové a jadrové membrány vstrebú, čím sa uvoľnia zvinuté slučky DNA – všeobecne nazývané nukleoidy – a fragmenty DNA. Elektroforézou pri vysokom pH sa dosiahnu štruktúry podobné kométam, ktoré je pri správnom fluorescečnom zafarbení možné pozorovať fluorescenčným mikroskopom; fragmenty DNA sa presúvajú smerom od „hlavy“ ku „chvostu“ podľa toho, aké sú veľké, pričom intenzita chvostu kométy v porovnaní s celkovou intenzitou (hlava a chvost) ukazuje rozsah zlomu DNA (13) (14) (15).

Alkalický kométový test *in vivo* je dôležitý najmä z hľadiska posúdenia genotoxického rizika, keďže odozvy pri tomto teste závisia od ADME *in vivo* (t. j. absorpcie, distribúcie, metabolizmu a exkrécie), ako aj od opravných procesov v DNA. Tieto sa môžu medzi jednotlivými druhmi, jednotlivými tkanivami a typmi poškodenia DNA líšiť.

▼M7

V snahe splniť požiadavky na dobré životné podmienky zvierat, zvlášť pokiaľ ide o obmedzenie používania zvierat (3 zásady „nahradiť, obmedziť a zjemniť“), je možné tento test zahrnúť aj do iných toxikologických štúdií napr. štúdií toxicity po opakovaných dávkach (10) (16) (17), alebo skombinovať sledovaný parameter s inými sledovanými genotoxickými parametrami ako napr. s *in vivo* skúškou mikrojadier erytrocytov na cicavcoch (18) (19) (20). Kométový test sa najčastejšie vykonáva na hlodavcoch, hoci bol použitý aj v prípade iných druhov cicavcov a necicavcov. Použitie iného druhu ako hlodavcov treba v jednotlivých prípadoch vedecky a eticky zdôvodniť, pričom sa dôrazne odporúča vykonávať kométový test na nehlodavcoch iba vtedy, ak je súčasťou inej toxikologickej štúdie, a nie samostatným testom.

Výber spôsobu expozície a tkaniva, resp. tkanív, ktoré sa majú skúmať, by sa mal stanoviť na základe všetkých dostupných/existujúcich poznatkov o testovanej chemikálii, napr. zamýšľaný/očakávaný spôsob expozície u ľudí, metabolizmus a distribúcia, potenciál vyvolať účinky v mieste kontaktu, štrukturálne riziká, iné údaje o genotoxicite alebo toxicite a účel štúdie. Preto je prípadne možné analyzovať genotoxický potenciál testovaných chemikálií v cieľovom tkanive, resp. tkanivách s karcinogénnymi a/alebo inými toxickými účinkami. Tento test sa považuje za užitočný aj pri ďalšom skúmaní genotoxicity zistenej systémom *in vitro*. Kométový test *in vivo* je vhodné vykonávať na skúmanom tkanive v prípade, že možno odôvodnene predpokladať adekvátnu expozíciu skúmaného tkaniva.

Tento test bol v doposiaľ najväčšom rozsahu validovaný v somatických tkanivách potkaních samcov kolaboratívnymi štúdiami napr. skúškou JaCVAM (12) a štúdiou Rothfuss *et al.*, 2010 (10). Pri medzinárodnej validačnej skúške JaCVAM sa použili pečeň a žalúdok. Pečeň preto, že ide o najaktívnejší orgán pri metabolizme chemikálií a často aj cieľový orgán karcinogenity. Žalúdok preto, že je po orálnej expozícii obyčajne prvým miestom kontaktu s chemikáliami, hoci za kontaktné tkanivá možno považovať aj iné oblasti gastrointestinálneho traktu, ako napríklad dvanástnik alebo lačník, ktoré sú relevantnejšie pre ľudí ako žľaznatý žalúdok hlodavcov. Treba však dbať na to, aby tieto tkanivá neboli vystavené nadmerne vysokým koncentráciám testovanej chemikálie (21). Túto techniku možno v zásade použiť v prípade akýchkoľvek tkanív, z ktorých sa dajú získať analyzovateľné jednobunkové/jadrové suspenzie. Interné údaje z viacerých laboratórií preukázali jej úspešnú použiteľnosť v prípade mnohých iných tkanív, pričom existuje množstvo publikácií, ktoré potvrdzujú použiteľnosť tejto techniky aj na iné orgány alebo tkanivá ako pečeň a žalúdok, napr. na lačník (22), obličky (23) (24), pokožku (25) (26), močový mechúr (27), (28), pľúca a bunky bronchoalveolárnej laváže (vhodné v prípade štúdií inhalovaných chemikálií) (29) (30), ako aj existenciu skúšok vykonaných na viacerých orgánoch (31) (32).

Napriek záujmu skúmať aj genotoxické účinky v zárodočných bunkách treba poznamenať, že štandardný alkalický kométový test opísaný v tejto testovacej metóde sa nepovažuje za vhodný na meranie zlomov v reťazcoch DNA zrelých zárodočných buniek. Keďže v odbornej literatúre týkajúcej sa použitia kométového testu na skúmanie genotoxoticity v zárodočných bunkách (33) sa uvádzajú vysoké a premenlivé pozaďové úrovne poškodenia DNA, pred zaradením kométového testu zrelých zárodočných buniek do tejto testovacej metódy sa za nevyhnutné považujú zmeny v protokole spolu so spresnením normalizačných a validačných štúdií. Navyše odporúčaný režim expozície opísaný v tejto testovacej metóde nie je optimálny a na zaručenie zmysluplnej analýzy zlomov v reťazcoch DNA zrelej spermie by si vyžadoval dlhšie expozície alebo časy odberu vzoriek. Genotoxické účinky merané kométovým testom v bunkách semenníkov v rôznych fázach ich diferenciácie boli už v odbornej literatúre opísané (34) (35). Napriek tomu treba poznamenať, že pohlavná žľaza obsahuje zmes somatických a zárodočných buniek. Preto pozitívne výsledky v celej pohlavnej žľaze (semenníku) nemusia nevyhnutne vyplývať z poškodenia zárodočných buniek, hoci dokazujú, že testovaná chemikália, resp. chemikálie a/alebo ich metabolity sa dostali do pohlavnej žľazy.

▼M7

Pri štandardných experimentálnych podmienkach kométového testu nie je možné spoľahlivo zistiť medzireťazcové krížne väzby. Ak sa však experimentálne podmienky určitým spôsobom upravia, umožní to zistiť medzireťazcové krížne väzby DNA-DNA a DNA-proteín, ako aj iné bázické zmeny napr. oxidované bázy (23) (36) (37) (38) (39). Adekvátna charakterizácia nevyhnutných zmien v protokole si však ešte vyžaduje ďalšie úsilie. Preto detekcia agensov spôsobujúcich medzireťazcové krížne väzby nie je primárnym účelom testu tak, ako je tu opísaný. Tento test nie je ani po úpravách vhodný na detekciu aneugénov.

Podľa súčasných poznatkov je v súvislosti s kométovým testom *in vivo* známych niekoľko ďalších obmedzení (pozri dodatok 3). Očakáva sa, že v budúcnosti dôjde k revízii tejto testovacej metódy, pri ktorej budú prípadne zohľadnené aj získané skúsenosti.

Pred použitím tejto testovacej metódy na zmesi s cieľom generovania údajov plánovaných na regulačné účely by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na tento účel a ak áno, tak prečo. Takéto úvahy nie sú potrebné v prípade, že existuje regulačná požiadavka na testovanie zmesi.

PRINCÍP METÓDY

Zvieratá sú vystavené účinkom testovanej chemikálie príslušným spôsobom (cestou). Podrobný opis dávkovania a odberu vzoriek je uvedený v bodoch 36 až 40. Vo vybranom čase, resp. časoch odberu vzoriek sa skúmané tkanivá rezom oddelia a pripravia jednobunkové/jadrové suspenzie (v prípade potreby, napr. ak ide o pečeň, je možné vykonať perfúziu *in situ*), ktoré sa vsadia do mäkkého agaru, aby sa na preparátoch znehybnili. Bunky/jadrá sa upravia lyzačným tlmivým roztokom, aby sa odstránila bunková a/alebo jadrová membrána a vystavia sa pôsobeniu silnej zásady napr. s pH $\geq$ 13 s cieľom rozpliesť DNA a uvoľniť voľné slučky a fragmenty DNA. DNA jadra v agare sa potom podrobí elektroforéze. Normálne nefragmentované molekuly DNA zostanú na mieste, v ktorom bola DNA jadra v agare, pričom všetky fragmenty DNA a voľné slučky DNA migrujú k anóde. Po elektroforéze sa DNA zobrazí použitím vhodného fluorescenčného zafarbenia. Prípravky by sa mali analyzovať mikroskopom a plnoautomatizovanými alebo poloautomatizovanými systémami analýzy obrazu. Rozsah migrácie DNA počas elektroforézy, ako aj jej dĺžka odrážajú množstvo a veľkosť fragmentov DNA. V kométovom teste je niekoľko sledovaných parametrov. Na posúdenie poškodenia DNA sa odporúča obsah DNA na chvoste (% chvostovej DNA alebo % hustoty na chvoste)(12) (40) (41) (42). Po analýze dostatočného počtu jadier sa údaje analyzujú vhodnými metódami, aby sa posúdili výsledky testu.

Treba poznamenať, že možnosti zmeny jednotlivých aspektov metodiky vrátane prípravy vzoriek, podmienok elektroforézy, parametrov vizuálnej analýzy (napr. intenzita zafarbenia, svetelná intenzita žiarovky mikroskopu a použitie mikroskopických filtrov a rozlišovacích schopností kamery) a podmienok okolia (napr. osvetlenie pozadia) boli predmetom skúmania a môžu ovplyvňovať migráciu DNA (43) (44) (45) (46).

OVEROVANIE ODBORNEJ SPÔSOBILOSTI LABORATÓRIA

Každé laboratórium by malo svoje experimentálne schopnosti na vykonanie kométového testu preukázať tým, že z každého cieľového tkaniva, resp. tkanív každého z použitých druhov dokáže získať jednobunkové alebo jadrové suspenzie dostatočnej kvality. Kvalita prípravkov sa najskôr hodnotí % chvostovej DNA na zvieratách ovplyvnených nosičom, ktoré patria do nižšieho rozsahu reprodukovateľnosti. Súčasné údaje naznačujú, že priemer skupiny, pokiaľ ide o % chvostovej DNA (na základe priemeru mediánov – pozri bod 57, v ktorom sú tieto pojmy vysvetlené) v pečeni potkanov, by nemal podľa možnosti prekročiť 6 %, čo by bolo v súlade s hodnotami z validačnej skúšky JaCVAM (12), ako aj z iných uverejnených a interných údajov. V súčasnosti neexistuje dostatočné množstvo údajov na to, aby bolo možné odporúčať optimálne alebo prijateľné rozpätia aj pre ďalšie tkanivá. To však nevylučuje použitie

▼M7

iných tkanív, ak je toto použitie opodstatnené. V skúšobnom protokole by malo byť uvedené hodnotenie výkonnosti kométového testu v týchto tkanivách v porovnaní s publikovanou odbornou literatúrou alebo na základe interných údajov. Po prvé, je vhodné, aby bolo % chvostovej DNA v kontrolách nízke, aby sa dosiahlo dostatočne dynamické rozpätie na detekciu pozitívneho účinku. Po druhé, každé laboratórium by malo byť schopné reprodukovať očakávané odpovede na priame mutagény a promutagény, a to s rôznymi spôsobmi účinku uvedenými v tabuľke 1 (bod 29).

Ak je to vhodné, môžu sa po odôvodnení a preukázaní jednoznačne pozitívnych odoziev v skúmaných tkanivách zvoliť pozitívne látky napr. z validačnej skúšky JaCVAM (12) alebo z iných uverejnených údajov (pozri bod 9). Preukázať by sa mala aj schopnosť detekcie slabých účinkov známych mutagénov, napr. EMS pri malých dávkach, napríklad dosiahnutím vzťahov medzi dávkou a odozvou s príslušnými číslami a intervalmi medzi dávkami. Počiatočné úsilie by malo byť zamerané na získanie odbornej spôsobilosti v prípade najčastejšie používaných tkanív, napr. pečene hlodavcov, kde možno porovnávať s existujúcimi údajmi a očakávanými výsledkami (12). Zároveň je možné získať údaje aj z iných tkanív, napr. žalúdka/dvanástnika/lačníka, krvi atď. Laboratórium musí preukázať odbornú spôsobilosť pri každom individuálnom tkanive a každom druhu, ktorý plánuje skúmať a bude musieť preukázať, že v danom tkanive dokáže získať prijateľnú pozitívnu reakciu so známym mutagénom (napr. EMS).

Údaje z nosiča/negatívnej kontroly by sa mali zozbierať preto, aby sa preukázala reprodukovateľnosť odoziev s negatívnymi údajmi a zaručila riadna kontrola technických aspektov, prípadne aby sa navrhla potreba nanovo stanoviť rozsahy historických kontrol (pozri bod 22).

Treba poznamenať, že napriek možnosti pitevného odberu viacerých tkanív a ich spracovania na účely kométovej analýzy musí byť laboratórium schopné získať viacero tkanív z jedného zvieraťa, a tým zaručiť, že sa nestratí žiadna z možných lézií DNA, a teda nedôjde k spochybneniu výsledkov kométovej analýzy. Čas medzi usmrtením a odobratím tkanív na spracovanie môže byť rozhodujúci (pozri bod 44).

Pri získavaní odbornej spôsobilosti na výkon tohto testu treba dbať na dobré životné podmienky zvierat, a preto je po nadobudnutí zručností vo viacerých aspektoch testu možné používať aj tkanivá zo zvierat použitých na iné testy. V jednotlivých fázach zavádzania novej testovacej metódy v laboratóriu navyše nemusí byť potrebné vykonávať kompletnú štúdiu, preto na nadobudnutie potrebných zručností bude stačiť menej zvierat alebo testovaných koncentrácií.

Údaje o historických kontrolách

Počas skúmania odbornej spôsobilosti by si laboratórium malo vybudovať historickú databázu, aby mohlo stanoviť rozsahy pozitívnych a negatívnych kontrol a distribúciu príslušných tkanív a druhov. Odporúčania na ukladanie a využívanie historických údajov (t. j. kritériá zaradenia a vylúčenia údajov do/z historických údajov a kritériá prijateľnosti pri danom pokuse) možno nájsť v literatúre (47). Rôzne tkanivá a rôzne druhy, ako aj rôzne nosiče a spôsoby podania môžu poskytovať iné hodnoty % chvostovej DNA získanej z negatívnej kontroly. Preto je dôležité stanoviť rozpätia negatívnych kontrol pre každé tkanivo a každý druh. Laboratóriá by mali používať metódy kontroly kvality, ako sú

▼M7

regulačné diagramy [napr. C-diagramy alebo diagramy Xbar (48)], aby zistili, do akej miery sú ich údaje variabilné a preukázali, že vo svojom laboratóriu majú danú metodiku „pod kontrolou“. Na účely detekcie slabých účinkov (pozri bod 17) môže byť potrebné optimalizovať výber látok vhodných na pozitívne kontroly, rozsahy dávok a experimentálne podmienky (napr. podmienky elektroforézy).

Všetky zmeny v skúšobnom protokole by sa mali zvážiť z hľadiska ich súladu s existujúcimi databázami historických kontrol laboratória. Každý výrazný nesúlad by mal viesť k vytvoreniu novej databázy historických kontrol.

OPIS METÓDY

Prípravky

Výber druhov zvierat

Bežne sa používajú známe laboratórne rody mladých zdravých dospelých hlodavcov (vo veku 6 až 10 týždňov na začiatku testovania, hoci prijateľné sú aj o niečo staršie zvieratá). Výber druhu hlodavcov by mal byť založený na i) druhoch používaných pri iných štúdiách toxicity (aby bolo možné údaje prepojiť a vykonávať integrované štúdie), ii) druhoch, u ktorých sa počas štúdie karcinogenity objavil nádor (pri skúmaní mechanizmu karcinogenézy) alebo iii) druhoch s metabolizmom najviac podobným metabolizmu ľudí, ak sú známe. Najčastejšie sa pri tomto teste používajú potkany. Môžu sa však použiť aj iné druhy, ak je ich použitie eticky a vedecky opodstatnené.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia zvierat

V prípade hlodavcov by ideálna teplota miestnosti pre pokusné zvieratá mala byť 22 °C (± 3 °C). Relatívna vlhkosť by mala byť v ideálnom prípade 50 – 60 %, minimálne 30 % a najlepšie nie viac ako 70 %, s výnimkou času čistenia miestnosti. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej chemikálie, keď sa podáva týmto spôsobom. Hlodavce by mali byť umiestnené v malých skupinách (zvyčajne najviac po päť) rovnakého pohlavia, pokiaľ sa nepredpokladá agresívne správanie. Zvieratá môžu byť umiestnené samostatne len vtedy, ak je to vedecky opodstatnené. Pokiaľ je to možné, mali by sa používať pevné podlahy, pretože podlahy z drôteného pletiva môžu spôsobiť vážne poranenia (49). Zvieratá musia mať zabezpečené vhodne stimulujúce prostredie.

Príprava zvierat

Zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a testovaných skupín. Označia sa jedinečným identifikátorom a najmenej päť dní pred začiatkom testu sa nechajú aklimatizovať na laboratórne podmienky. Na označenie zvierat jedinečným identifikátorom treba použiť tú najmenej invazívnu metódu. Medzi vhodné metódy označenia patria krúžky, visačky, mikročipy a biometrická identifikácia. Odsekávanie prstov a prepichovanie uší sa v týchto testoch nepovažuje za vedecky opodstatnené. Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné následky vyplývajúce z umiestnenia klietok. Na začiatku štúdie by mala hmotnosť zvierat kolísať len minimálne a nemala by presiahnuť ± 20 %.

Príprava dávok

Testované chemikálie v tuhej forme by sa pred podaním zvieratám mali rozpustiť alebo rozptýliť vo vhodných nosičoch alebo primiešať do krmiva či pitnej vody. Kvapalné testované chemikálie sa môžu podávať priamo alebo rozriedené pred podávaním. V prípade inhalačných expozícií sa testované chemikálie môžu v závislosti od svojich fyzikálnochemických vlastností podávať ako plyn, výpary alebo tuhé/kvapalné aerosóly (50) (51).

▼M7

Ak údaje o stabilite nepreukazujú prijateľnosť uskladnenia a nestanovujú vhodné podmienky skladovania, mali by sa používať čerstvo pripravené testované chemikálie.

Podmienky testu

Nosič

Nosič by nemal vyvolávať toxické účinky v používaných objemoch dávok a nemali by chemicky reagovať s testovanými chemikáliami. Ak sa používajú iné ako dobre známe nosiče, ich použitie by malo byť podporené referenčnými údajmi, ktoré poukazujú na ich kompatibilitu, pokiaľ ide o testované zvieratá, spôsoby podania dávky a sledovaný parameter. Vždy, keď to je možné, odporúča sa najprv zvážiť použitie vodného rozpúšťadla/nosiča. Treba poznamenať, že niektoré nosiče (najmä tie viskózne) môžu vyvolať zápal a zvýšiť tak pozaďové úrovne zlomov v reťazcoch DNA v mieste kontaktu, najmä pri viacnásobnom podaní.

Kontroly

Pozitívne kontroly

V tejto chvíli by sa obyčajne mala do testu zahrnúť skupina minimálne 3 analyzovateľných zvierat jedného pohlavia alebo v prípade použitia oboch pohlaví aj druhého pohlavia (pozri bod 32), ovplyvnených látkou na pozitívnu kontrolu. V budúcnosti možno bude reálne preukázať primeranú odbornú spôsobilosť na zníženie potreby pozitívnych kontrol. V prípade viacerých časov odberu vzoriek (napr. s jediným administratívnym protokolom) stačí pozitívne kontroly zahrnúť iba do jedného z časov odberu, treba však zabezpečiť vyváženosť (pozri bod 48). Súbežne podávané látky na pozitívnu kontrolu nemusia byť podané rovnakou cestou ako testovaná chemikália, je však dôležité, aby sa pri meraní účinkov v mieste kontaktu použila rovnaká cesta. Látky na pozitívnu kontrolu by mali vyvolať zlomy v reťazcoch DNA všetkých skúmaných tkanív v prípade testovanej chemikálie, pričom je pravdepodobné, že zvolenou pozitívnou kontrolou bude mutagén EMS, ktorý spôsobil zlomy v reťazcoch DNA všetkých tkanív, ktoré boli predmetom výskumu. Dávky látok na pozitívnu kontrolu by sa mali zvoliť tak, aby spôsobovali mierne účinky, ktoré umožnia kriticky zhodnotiť výkonnosť a citlivosť testu, a mohli by vychádzať z kriviek závislosti odozvy od dávky stanovených laboratóriom na účely preukázania odbornej spôsobilosti. % chvostovej DNA u súbežných zvierat určených na pozitívnu kontrolu by mali byť v súlade s rozpätím vopred stanoveným laboratórnom pre každé jedno tkanivo a čas odberu vzoriek pri daných druhoch (pozri bod 16). Príklady látok na pozitívnu kontrolu a niektorých ich cieľových tkanív (u hlodavcov) sú uvedené v tabuľke 1. Vo vedecky opodstatnenom prípade sa môžu zvoliť (aj) iné látky ako tie, ktoré sú uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Príklady látok na pozitívnu kontrolu a niektorých ich cieľových tkanív

Látky a čísla v registri CAS
etyl-metánsulfonát (CAS č. 62-50-0) pre všetky tkanivá
etyl-nitrózomočovina (CAS č. 759-73-9) v prípade pečene a žalúdka, dvanástnika alebo lačníka
metyl-metánsulfonát (CAS č. 66-27-3) v prípade pečene, žalúdka, dvanástnika alebo lačníka, buniek pľúcnej a bronchoalveolárnej laváže (BAL), obličiek, močového mechúra, pľúc, semenníkov a kostnej drene/krvi
N-metyl-*N*′-nitro-*N*-nitrózoguanidín (CAS č. 70-25-7) v prípade žalúdka, dvanástnika alebo lačníka
1,2-dimetylhydrazín, dihydrochlorid (CAS č. 306-37-6) v prípade pečene a čriev
N-metyl-*N*-nitrózomočovina (CAS č. 684-93-5) v prípade pečene, kostnej drene, krvi, obličiek, žalúdka, lačníka a mozgu.

▼M7

Negatívne kontroly

Súčasťou každého testu by pri každom čase odberu vzoriek a každom tkanive mala byť skupina zvierat určených na negatívnu kontrolu, ovplyvnených iba nosičom a inak ovplyvnených rovnakým spôsobom ako pokusné skupiny. Percento chvostovej DNA by v prípade zvierat určených na negatívnu kontrolu malo byť v rozsahu pozaďových hodnôt, ktoré laboratórium vopred stanovilo pre každé jedno tkanivo a čas odberu vzoriek u daných druhov (pozri bod 16). Ak neexistujú historické alebo publikované kontrolné údaje, ktoré by preukazovali vyvolanie škodlivých alebo genotoxických účinkov zvoleným nosičom, počtom podaní látky alebo cestou jej podania, mali by sa pred vykonaním úplnej štúdie realizovať prvotné štúdie, ktoré umožnia stanoviť prijateľnosť kontroly s nosičom.

POSTUP

Počet zvierat a ich pohlavie

Hoci je len málo údajov o zvieratách samičieho pohlavia, z ktorých by sa dalo urobiť porovnanie medzi pohlaviami z hľadiska kométového testu, vo všeobecnosti platí, že iné genotoxické odozvy *in vivo* sú medzi samcami a samicami podobné, a preto je možné väčšinu štúdií vykonávať na oboch pohlaviach. Údaje dokazujúce príslušné rozdiely medzi samcami a samicami (napr. rozdiely v systémovej toxicite, metabolizme, biodostupnosti atď. vrátane napr. štúdie na zistenie rozsahu) hovoria v prospech používania oboch pohlaví. V tomto prípade môže byť vhodné vykonať štúdiu na oboch pohlaviach, napr. ako súčasť štúdie toxicity po opakovaných dávkach. Ak sa použijú obe pohlavia, mohlo by byť vhodné využiť plánovanie pokusov. Podrobnosti o analýze údajov použitím tohto plánovania sú uvedené v dodatku 2.

Mali by sa stanoviť veľkosti skupín na začiatku štúdie (a počas získavania odbornej spôsobilosti) s cieľom dosiahnuť minimálne 5 analyzovateľných zvierat jedného pohlavia alebo v prípade použitia oboch pohlaví každého pohlavia, na skupinu (menej v prípade súbežnej pozitívnej kontrolnej skupiny – pozri bod 29). Ak sa vystavenie ľudí chemikáliám môže viazať na pohlavie, ako napríklad pri niektorých farmaceutikách, mal by sa test vykonať na príslušnom pohlaví. Ako pomôcku týkajúcu sa maximálnych typických požiadaviek na zvieratá možno uviesť, že štúdia realizovaná v súlade s parametrami stanovenými v bode 33 s tromi skupinami dávok a súbežnými negatívnymi a pozitívnymi kontrolami (každá skupina zložená z piatich zvierat jedného pohlavia) by si vyžadovala okolo 25 až 35 zvierat.

HARMONOGRAM OVPLYVŇOVANIA

Zvieratá by mali byť ovplyvnené každý deň v trvaní 2 alebo viac dní (t. j. približne dve alebo viac ošetrení v približne 24-hodinových intervaloch), pričom vzorky sa odoberú raz za 2 – 6 hodín (alebo za T_{max}) po poslednom ovplyvnení (12). Akceptujú sa aj vzorky z predĺžených dávkovacích režimov (napr. 28-dňové každodenné dávkovanie). Bola preukázaná úspešná kombinácia kométovej analýzy s testom mikrojadier erytrocytov (10) (19). Dôkladnú pozornosť však treba venovať logistike odberu vzoriek tkanív na účely kométovej analýzy, ako aj požiadavkám na odber vzoriek tkanív na iné typy toxikologických hodnotení. Odber 24 hodín po poslednej dávke, ktorý je typický pre všeobecné štúdie toxicity, nie je vo väčšine prípadov vhodný (pozri bod 40 o čase odberu vzoriek). Použitie iných harmonogramov ovplyvňovania a odberu vzoriek by sa malo zdôvodniť (pozri dodatok 3). Napríklad je možné použiť jedno ovplyvnenie s viacerými odbermi vzoriek, treba však poznamenať, že štúdia s jedným podaním látky si vyžiada viac zvierat, pretože bude potrebných niekoľko časov odberu vzoriek, hoci v niektorých prípadoch to môže byť tá preferovanejšia voľba, napr. ak testovaná chemikália po opakovaných podaniach vyvolá nadmernú toxicitu.

▼M7

Bez ohľadu na spôsob vykonania testu sa považuje za prijateľné, ak testovaná chemikália vykazuje pozitívnu odozvu, alebo ak sa v prípade negatívnej štúdie získajú priame alebo nepriame dôkazy podporujúce expozíciu cieľového tkaniva, resp. tkanív, alebo ich toxicitu, prípadne ak sa dosiahne limitná dávka (pozri bod 36).

Aby sa uľahčilo podanie veľkého objemu látky, môžu byť testované chemikálie podávané aj v rozdelených dávkach, t. j. dve ovplyvnenia v jeden deň, medzi ktorými neuplynú viac ako 2 až 3 hodiny. Za týchto okolností by sa mal čas odberu vzoriek naplánovať podľa času podania poslednej dávky (pozri bod 40).

Úrovne dávok

Ak sa vykoná predbežná štúdia na zistenie rozsahu dávky z dôvodu nedostatku adekvátnych údajov dostupných z iných relevantných štúdií, ktoré by pomohli pri výbere dávky, mala by sa vykonať v tom istom laboratóriu použitím toho istého druhu, rodu, pohlavia a tej istej dávkovacej schémy ako v hlavnej štúdii a podľa súčasných prístupov k vykonávaniu štúdie na zistenie rozsahu dávky. Takáto štúdia by sa mala zamerať na identifikáciu maximálnej tolerovanej dávky (MTD) definovanej ako dávka, ktorá v porovnaní s časom trvania štúdie vyvolá mierne toxické účinky (napr. jasné klinické príznaky, ako napríklad nezvyčajné správanie alebo reakcie, mierny úbytok alebo cytotoxicita v cieľovom tkanive), nie však smrť alebo známky bolesti, utrpenia, príp. ťažkosti, ktoré si vyžiadajú usmrtenie. V prípade netoxických testovaných chemikálií, ktoré sú podávané po 14 dňoch, príp. ešte neskôr, je maximálna (limitná) dávka 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň. V prípade časov podania kratších ako 14 dní je maximálna (limitná) dávka 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň. V prípade určitých typov testovaných chemikálií (napr. farmaceutiká na humánne použitie), ktoré sa riadia osobitnými predpismi, sa môžu tieto limity líšiť.

Chemikálie vykazujúce saturáciu toxikokinetických vlastností alebo vyvolávajúce detoxifikačné procesy, ktoré môžu viesť k zníženiu expozície po dlhodobom podávaní, môžu byť výnimkami z kritérií stanovovania dávok a mali by sa hodnotiť jednotlivo.

Tak v prípade akútnej, ako aj subakútnej verzie kométového testu by sa okrem maximálnej dávky (MTD – maximálna možná dávka, maximálna expozícia alebo limitná dávka) mala na účely preukázania závislosti odoziev od dávky pre každý čas odberu vzoriek zvoliť klesajúca postupnosť najmenej dvoch dodatočných úrovní dávok s primeraným odstupom (najlepšie oddelených menej ako $\sqrt{10}$). Prednostne by však použité úrovne dávok mali pokrývať rozsah od maximálnej po malú, resp. žiadnu toxicitu. Ak sa v cieľovom tkanive objavia známky toxicity pri všetkých testovaných úrovniach dávok, odporúča sa vykonať ďalšiu štúdiu s netoxickými dávkami (pozri body 54 – 55). Štúdie, ktoré majú podrobnejšie preskúmať tvar krivky závislosti odozvy od dávky, si môžu vyžadovať dodatočnú skupinu, resp. skupiny dávok.

Podávanie dávok

Pri plánovaní testu by sa mal zvážiť predpokladaný spôsob expozície ľudí. Preto sa za opodstatnené považuje zvoliť spôsoby vystavenia ako jedlom, pitnou vodou, podkožne, intravenózne, orálne (sondou), inhaláciou, intratracheálne alebo implantáciou. V každom prípade by sa mal zvoliť taký spôsob, ktorým sa zaručí adekvátna expozícia cieľového tkaniva, resp. tkanív. Intraperitoneálna injekcia sa vo všeobecnosti neodporúča, keďže nejde o typický spôsob expozície ľudí, a preto by sa mala použiť iba v konkrétnych odôvodnených prípadoch (napr. ak ide o látky na pozitívne kontroly, na výskumné účely, alebo o lieky, ktoré sú podávané intraperitoneálne). Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže

▼M7

naraz podávať sondou alebo injekciou, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Objem nemá byť vyšší ako 1 ml/100 g telesnej hmotnosti, okrem vodných roztokov, keď sa môže použiť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Požitie väčších objemov ako uvedený objem (pokiaľ to dovoľujú predpisy o dobrých životných podmienkach zvierat) by sa malo zdôvodniť. Všade, kde je to možné, by sa mali dosiahnuť rôzne úrovne dávok, a to upravením koncentrácie v zložení dávky, aby sa pri všetkých úrovniach dávok zabezpečil konštantný objem v pomere k telesnej hmotnosti.

Čas odberu vzoriek

Čas odberu vzoriek je kritickou premennou, pretože je určený obdobím potrebným na dosiahnutie maximálnej koncentrácie testovanej chemikálie v cieľovom tkanive a vyvolanie zlomov v reťazcoch DNA, avšak skôr, ako sa tieto zlomy odstránia, opravia alebo spôsobia bunkovú smrť. Výskyt niektorých lézií, ktoré spôsobili zlomy v reťazcoch DNA zistené kométovým testom, môže mať veľmi krátke trvanie, a to aspoň v prípade niektorých chemikálií testovaných *in vitro* (52) (53). Preto by sa v prípade, že sa takéto prechodné lézie DNA objavia, mali prijať opatrenia na zmiernenie ich straty tým, že sa zabezpečí, aby sa odber vzoriek z tkanív vykonal v dostatočnom predstihu, pokiaľ možno skôr, ako nastanú štandardné časy uvedené nižšie. Optimálny čas, resp. časy odberu vzoriek môžu závisieť od chemikálie alebo spôsobu/cesty napr. rýchla expozícia tkaniva s intravenóznym podaním alebo inhalačnou expozíciou. Preto by sa časy odberu vzoriek mali určovať z kinetických údajov, ak sú dostupné [napr. čas (T_{max}), za ktorý sa dosiahne najvyššia koncentrácia v plazme alebo tkanive (C_{max}), alebo ustálený stav v prípade viacnásobných podaní]. Pri absencii kinetických údajov sa za vhodný kompromis pri meraní genotoxicity považuje odber vzoriek po 2 – 6 hodinách od posledného testovania v prípade dvoch alebo viacerých testovaní, alebo po 2 – 6 a opäť po 16 – 26 hodinách po jednorazovom podaní, pričom však treba dbať na to, aby boli všetky zvieratá pitvané v tom istom čase od poslednej (príp. jedinej) dávky. Na výber vhodných časov odberu vzoriek je možné použiť aj informácie o výskyte toxických účinkov na cieľové orgány (ak sú k dispozícii).

Pozorovania

Najmenej raz denne, najlepšie v rovnakom čase, resp. časoch a po zohľadnení periódy najvyššej intenzity očakávaných účinkov po dávkovaní (54), by sa mali vykonať a zaznamenať všeobecné klinické pozorovania v súvislosti so zdravím zvierat. Najmenej dvakrát denne je u všetkých zvierat potrebné sledovať chorobnosť a úmrtnosť. Ak ide o dlhšie trvajúce štúdie, všetky zvieratá by sa mali aspoň raz týždenne a potom na konci obdobia testu odvážiť. Spotreba potravy by sa mala merať pri každej výmene potravy a aspoň raz za týždeň. Ak sa testovaná chemikália podáva v pitnej vode, mala by sa pri každej výmene vody a aspoň raz za týždeň odmerať spotreba vody. Zvieratá, ktoré nevykazujú smrteľné dávky nadmernej toxicity, by sa mali pred dokončením testovacieho obdobia usmrtiť a vo všeobecnosti sa na účely kométového testu nepoužívať.

Odber tkaniva

Keďže je možné skúmať indukciu zlomov v reťazcoch DNA (kométy) prakticky v každom tkanive, rozhodnutie o výbere tkaniva, resp. tkanív, ktoré sa majú odobrať, by malo byť jasne vysvetlené a podložené dôvodom vykonania štúdie spolu so všetkými existujúcimi údajmi o ADME, genotoxicite, karcinogenite alebo inej toxicite v prípade testovaných chemikálií, ktoré sú predmetom skúmania. Medzi dôležité faktory, ktoré treba zvážiť, patrí spôsob podania látky (založený na pravdepodobnom spôsobe, resp. spôsoboch expozície ľudí), predpokladaná distribúcia a absorpcia v tkanive, úloha metabolizmu, ako aj možný mechanizmus pôsobenia testovanej chemikálie. Pečeň je najčastejšie skúmaným tkanivom s najväčším počtom údajov. Preto pri absencii akýchkoľvek podkladových informácií, alebo ak sa neurčí žiadne konkrétne tkanivo záujmu, sa odber vzoriek z pečene považuje za opodstatnený, pretože ide o primárne miesto xenobiotického metabolizmu a zároveň orgán, ktorý je často vystavený tak materskej

▼M7

látke, resp. látkam, ako aj metabolitu, resp. metabolitom. V niektorých prípadoch môže byť najlepšie skúmať v mieste priameho kontaktu (napr. v prípade chemikálií podávaných ústne – žľaznatý žalúdok alebo dvanástnik/lačník alebo v prípade inhalovaných chemikálií – pľúca). Na základe špecifických dôvodov vykonávania testu by sa mali vybrať dodatočné alebo alternatívne tkanivá, ale môže byť užitočné preskúmať viaceré tkanivá tých istých zvierat za predpokladu, že laboratórium preukázalo spôsobilosť pracovať s týmito tkanivami a dokáže zvládnuť viacero tkanív naraz.

Príprava skúšobných vzoriek

V prípade procesov opísaných v týchto bodoch (44 až 49) je dôležité, aby sa všetky roztoky, príp. stabilné suspenzie použili do dátumu exspirácie, alebo aby sa v prípade potreby pripravovali čerstvé. V uvedených bodoch sa uvádza aj to, že časy potrebné na i) odobratie každého tkaniva po pitve, ii) spracovanie každého tkaniva do bunkových/jadrových suspenzií a iii) spracovanie suspenzie a prípravu preparátov sa považujú za kritické premenné (pozri definície v dodatku 1), pričom správna dĺžka času na každý z týchto krokov by sa mala určiť v čase zavádzania metódy a preukazovania spôsobilosti.

Zvieratá sa vo vhodnom čase, resp. časoch po poslednom podaní testovanej chemikálie usmrtia v súlade s platnými právnymi predpismi v oblasti dobrých životných podmienok zvierat a so zásadami princípu „nahradiť, obmedziť a zjemniť“. Vybrané tkanivo, resp. tkanivá sa odoberú, oddelia rezom a časť sa použije na kométový test, pričom sa zároveň iná časť z tej istej časti tkaniva odreže a vloží do roztoku formaldehydu alebo vhodného fixačného prostriedku na účely možnej histopatologickej analýzy (pozri bod 55) podľa štandardných metód (12). Tkanivo určené na kométový test sa umiestni do rozmeľovacieho tlmivého roztoku, poriadne sa opláchne studeným rozmeľovacím tlmivým roztokom, aby sa odstránili zvyšky krvi a až do spracovania sa skladuje v ľadovom rozmeľovacom tlmivom roztoku. Môže sa vykonať aj perfúzia *in situ*, napr. pri pečeni alebo obličkách.

Na tému izolácie buniek/jadier existuje mnoho publikovaných metód. Patria medzi ne rozomieľanie tkanív napr. pečene a obličiek, škrabanie mukóznych povrchov v prípade gastrointestinálneho traktu, homogenizácia a enzymatické natrávenie. Predmetom validačnej skúšky JaCVAM bolo iba štúdium izolovaných buniek, preto sa pri zavádzaní metódy a odvolávaní sa na údaje zo skúšky JaCVAM na účely preukázania spôsobilosti uprednostňujú izolované bunky. Ukázalo sa však, že bez ohľadu na to, či sa použijú izolované bunky alebo jadrá, vo výsledku testu nie je žiaden podstatný rozdiel (8). Aj v prípade rôznych metód izolovania buniek/jadier (napr. homogenizácia, rozomieľanie, enzymatické natrávenie a filtrácia cez sito) sa dosiahli porovnateľné výsledky (55). Preto je možné použiť buď izolované bunky alebo izolované jadrá. Laboratórium by malo dôkladne vyhodnotiť a potvrdiť platnosť tkanivových metód izolácie samostatných buniek/jadier. Ako už bolo opísané v bode 40, výskyt niektorých lézií, ktoré spôsobia zlomy v reťazcoch DNA zistené kométovým testom, môže mať len veľmi krátke trvanie (52) (53). Preto je bez ohľadu na použitú metódu prípravy jednobunkovej/jadrovej suspenzie dôležité, aby sa tkanivá spracovali čo najskôr po tom, ako boli zvieratá usmrtené a umiestnené do podmienok, vďaka ktorým sa zníži potreba odstraňovania lézií (napr. uchovávaním tkaniva pri nízkej teplote). Bunkové suspenzie by sa mali až do samotného použitia uchovávať ľadové, aby sa minimalizovali odchýlky medzi vzorkami a dosiahli správne pozitívne a negatívne kontroly.

▼M7

PRÍPRAVA PREPARÁTOV

Preparáty by sa mali pripravovať čo najskôr (v ideálnom prípade do jednej hodiny) po preparovaní jednej bunky/jadra, pričom teplota a čas medzi smrťou zvieraťa a prípravou preparátov by mali byť prísne kontrolované a validované v laboratórnych podmienkach. Objem bunkovej suspenzie pridanej do agarózy s nízkym bodom topenia (zvyčajne 0,5 – 1,0 %) na prípravu sklíčok by nemal znížiť percentuálny podiel agarózy s nízkym bodom topenia na menej ako 0,45 %. Optimálna hustota buniek sa stanoví systémom analýzy obrazu používaným na zápis komét.

Lýza

Aj podmienky lýzy patria ku kritickým premenným veličinám a môžu narušať zlomy v reťazcoch vyvolané špecifickými typmi modifikácie DNA (niektoré alkylácie DNA a bázické adukty). Preto sa odporúča, aby sa pri všetkých preparátoch v rámci pokusu udržiavali pokiaľ možno konštantné podmienky lýzy. Po príprave by sa preparáty mali aspoň na jednu hodinu (alebo na noc) ponoriť do lyzačného roztoku pri teplote okolo 2 – 8 °C, tlmenom osvetlení, tzv. žlté svetlo (alebo podmienky odolné proti svetlu), aby nedošlo k ich vystaveniu účinkom bieleho svetla, ktoré môže obsahovať zložky UV žiarenia. Po tejto inkubačnej lehote sa preparáty opláchnu, aby sa pred fázou alkalického rozpletania odstránili zvyšky detergentu a soli. Robí sa to čistenou vodou, neutralizačným alebo fosfátovým tlmivým roztokom. Môže sa použiť aj elektroforézny tlmivý roztok. Vďaka tomu sa v elektroforéznej komore zachovajú alkalické podmienky.

Rozpletanie a elektroforéza

Preparáty sa náhodne umiestnia do zariadenia na ponorkovú elektroforézu obsahujúceho dostatočné množstvo roztoku tak, aby boli povrchy preparátov úplne ponorené (aj hĺbka ponoru by mala byť pri každom pokuse konzistentná). Pri iných typoch elektroforéznych zariadení na účely kométového testu, t. j. s aktívnym chladením, cirkuláciou a vysokokapacitným zdrojom energie, bude mať väčší ponor v roztoku za následok vyšší elektrický prúd, pričom napätie bude naďalej konštantné. Preparáty by sa do elektroforéznej nádoby mali umiestňovať vyváženým spôsobom, aby sa zmiernili účinky akýchkoľvek trendov alebo okrajových účinkov v nádobe a minimalizovali odchýlky medzi jednotlivými dávkami, t. j. pri každej elektroforéze by mal existovať rovnaký počet preparátov z každého skúmaného zvieraťa vrátane vzoriek z rôznych skupín dávok, negatívnych a pozitívnych kontrol. Preparáty by sa mali nechať aspoň 20 minút postáť, aby mohlo dôjsť k rozpleteniu DNA, a potom podrobiť elektroforéze za kontrolovaných podmienok, ktoré umožnia maximalizovať citlivosť a dynamický rozsah testu (napr. dosiahnuť prijateľné úrovne % chvostovej DNA pri negatívnych a pozitívnych kontrolách, ktoré maximalizujú citlivosť). Úroveň migrácie DNA je priamo úmerná tak dĺžke trvania elektroforézy, ako aj potenciálu (V/cm). Podľa skúšky JaCVAM by to mohlo byť 0,7 V/cm pri najmenej 20 minútach. Dĺžka trvania elektroforézy sa považuje za kritickú premennú, pričom čas elektroforézy by mal byť stanovený, aby sa optimalizoval dynamický rozsah.

▼M7

Dlhšie elektroforézne časy (napr. 30 alebo 40 minút na maximalizáciu citlivosti) obyčajne vedú k výraznejším pozitívnym odozvám v prípade známych mutagénov. Dlhšie elektroforézne časy však môžu viesť aj k nadmernej migrácii v kontrolách. Napätie by malo pri každom pokuse zostať konštantné a odchýlky v prípade iných parametrov by mali byť v malom a stanovenom rozsahu napr. pri skúške JaCVAM sa pri 0.7 V/cm dosiahol štartovací prúd 300 mA. Hĺbka tlmivého roztoku by sa mala upraviť tak, aby bolo možné dosiahnuť požadované podmienky a zachovať ju počas celého pokusu. Hodnoty prúdu na začiatku a na konci elektroforézy by sa mali zaznamenať. Optimálne podmienky pre každé skúmané tkanivo by sa preto v príslušnom laboratóriu mali určovať v priebehu počiatočného preukazovania spôsobilosti. Teplota elektroforézneho roztoku počas rozpletania a elektroforézy by mala zostať nízka, obyčajne 2 – 10 °C (10). Teplota elektroforézneho roztoku na začiatku rozpletania, začiatku a konci elektroforézy by sa mala zaznamenať.

Po dokončení elektroforézy by sa preparáty mali aspoň 5 minút ponáraťoplachovať neutralizačným tlmivým roztokom. Gély možno zafarbiť a hodnotiť „čerstvé“ (napr. do 1 – 2 dní), príp. ich dehydrovať na účely neskoršieho hodnotenia (napr. do 1 až 2 týždňov po zafarbení) (56). Tieto podmienky by sa však mali validovať v priebehu preukazovania spôsobilosti, pričom by sa mali získať a osobitne uchovať historické údaje týkajúce sa každej z týchto podmienok. V druhom prípade by sa preparáty mali dehydrovať ponorením na najmenej 5 minút do absolútneho etanolu, nechať oschnúť na vzduchu a potom až do hodnotenia skladovať buď pri izbovej teplote, alebo v nádobe v chladničke.

Metódy merania

Kométy by sa mali hodnotiť kvantitatívne pomocou automatických alebo poloautomatických systémov analýzy obrazu. Preparáty sa zafarbia primeraným fluorescenčným farbivom napr. zlatou SYBR, zelenou I (*green* I), propídium-jodidom alebo etídium-bromidom a merajú pri vhodnom zväčšení (napríklad 200-násobnom) pod epifluorescenčným mikroskopom s vhodnými detektormi alebo na digitálnej kamere (napr. CCD).

Bunky možno zaradiť do troch kategórií opísaných v atlase kométových snímok (57), a to hodnotiteľné, nehodnotiteľné a tzv. ježe (*hedgehog*) (ďalšie podrobnosti sú uvedené v bode 56). Na účely výpočtu % chvostovej DNA by sa mali hodnotiť iba hodnotiteľné bunky (jasne vymedzená hlava a chvost, bez interferencie so susednými bunkami), aby sa zabránilo artefaktom. Frekvenciu výskytu nehodnotiteľných buniek netreba zapisovať do protokolu. Frekvencia výskytu „ježov“ by sa mala určovať na základe vizuálneho hodnotenia (keďže im chýba jasne definovaná hlava, čo sťažuje ich detekciu analýzou obrazu) minimálne 150 buniek na vzorku (ďalšie podrobnosti sú uvedené v bode 56) a zvlášť zapísať.

Všetky preparáty určené na analýzu vrátane negatívnych a pozitívnych kontrol by mali byť nezávisle označené kódmi a hodnotené ako „slepé“, aby hodnotiteľ nepoznal spôsob ich ovplyvnenia. Z každej vzorky (jedno tkanivo na zviera) by sa malo analyzovať najmenej 150 buniek (s výnimkou „ježov“ – pozri bod 56). Hodnotenie 150 buniek na zviera s minimálne 5 zvieratami na jednu dávku (menej pri súbežnej pozitívnej kontrole – pozri bod 29) poskytuje podľa analýzy Smith *et al.*, 2008 (5) primeranú štatistickú výpovednú hodnotu. Ak sa používajú preparáty, mohlo by ísť o hodnotenie 2 alebo 3 preparátov na vzorku, ak je v skupine päť zvierat. Pozorovania by sa mali vykonať vo viacerých oblastiach preparátu s hustotou, ktorá zaručí, že nedôjde k prekrývaniu chvostov. Okraje preparátov by sa nemali hodnotiť.

Zlomy v reťazcoch DNA možno v kométovom teste merať nezávislými sledovanými parametrami, ako je % objemu chvostovej DNA, dĺžka a tzv. tail moment. Všetky tri merania možno vykonať použitím vhodného systému so softvérom na analýzu obrazu. Na vyhodnotenie a interpretáciu výsledkov (12) (40) (41) (42) sa však odporúča použiť % chvostovej DNA (tiež známe ako % hustoty na chvoste), ktoré je dané hustotou fragmentov DNA na chvoste vyjadrenou ako percento z celkovej hustoty buniek (13).

▼M7

Poškodenie tkaniva a cytotoxicita

Pozitívne nálezy v kométovom teste nemusia byť nutne výsledkom genotoxicity, keďže aj toxicita cieľového tkaniva môže mať za následok nárast migrácie DNA (12) (41). A naopak, nízka alebo mierna cytotoxicita je často výsledkom známych genotoxínov (12), z čoho vyplýva, že pri samotnom kométovom teste nie je možné rozlíšiť migráciu DNA vyvolanú genotoxicitou od migrácie vyvolanej cytoxocitou. Ak sú však pozorované nárasty migrácie DNA, odporúča sa preskúmať jeden alebo viacero ukazovateľov cytotoxicity, čo môže pomôcť pri interpretácii zistení. Nárasty migrácie DNA v prítomnosti jasných dôkazov cytotoxicity by sa mali interpretovať opatrne.

Bolo navrhnutých mnoho meraní cytotoxicity, spomedzi ktorých sa za najvhodnejší spôsob merania toxicity tkaniva považujú histopatologické zmeny. Pozorované javy, ako je zápal, bunková infiltrácia, apoptózové alebo nekrotické zmeny, sú spájané s nárastom migrácie DNA, no validačná skúška JaCVAM (12) potvrdila, že neexistuje žiadny konečný zoznam histopatologických zmien, ktoré sa vždy spájajú so zvýšenou migráciou DNA. Aj zmeny v klinických chemických ukazovateľoch (napr. AST, ALT) môžu poskytnúť užitočné informácie o poškodení tkaniva, pričom do úvahy je možné vziať aj ďalšie ukazovatele, napr. aktiváciu kaspázy, farbivo TUNEL, farbivo Annexin V atď. Existuje však len obmedzené množstvo publikovaných údajov o použití spomínaných ďalších ukazovateľov v štúdiách *in vivo*, pričom niektoré sú viac a iné menej spoľahlivé.

„Ježe“ (alebo tiež *hedgehogs*, *clouds* alebo *ghost cells*) sú bunky, ktoré vytvárajú mikroskopický obraz pozostávajúci z malých alebo neexistujúcich hláv a veľkých, rozptýlených chvostov, a považujú sa za bunky s ťažkým poškodením, hoci etiológia „ježov“ je neistá (pozri dodatok 3). Pre ich vzhľad sú merania % chvostovej DNA analýzou obrazu nespoľahlivé, preto by sa „ježe“ mali vyhodnocovať osobitne. Výskyt „ježov“ by sa mal zaznamenať a uviesť do protokolu, pričom akýkoľvek relevantný nárast, ktorý sa považuje za následok testovanej chemikálie, by sa mal dôsledne preskúmať a interpretovať. Pri týchto úvahách môžu pomôcť aj poznatky o potenciálnom spôsobe pôsobenia testovanej chemikálie.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Spracovanie výsledkov

Zviera je pokusná jednotka, a preto by sa tak údaje o jednotlivých zvieratách, ako aj zhrnutie výsledkov mali uvádzať v tabuľke. Vzhľadom na hierarchickú povahu údajov sa odporúča, aby sa pri každom preparáte určilo priemerné % chvostovej DNA a pri každom zvierati vypočítal priemer stredných hodnôt (12). Potom sa určí priemer z priemerov za jednotlivé zvieratá, aby sa získal priemer za skupinu. Všetky tieto hodnoty by sa mali zapísať do protokolu. Môžu sa použiť aj alternatívne prístupy (pozri bod 53), ak sú vedecky a štatisticky opodstatnené. Štatistické analýzy možno urobiť použitím rôznych prístupov (58) (59) (60) (61). Pri výbere štatistických metód, ktoré sa majú použiť, by sa mala na základe skutočností uvedených v spomínaných odkazoch na literatúru zvážiť potreba transformácie údajov (napr. logaritmicky alebo druhou odmocninou) a/alebo pripočítania malého čísla (napr. 0,001) ku všetkým (dokonca aj nenulovým) hodnotám, aby sa minimalizovali účinky nulových bunkových hodnôt. Podrobnosti o analýze interakcií medzi spôsobom ovplyvnenia a pohlavím zvierat v prípade použitia oboch pohlaví, ako aj následná analýza údajov pri zistení, prípadne nezistení rozdielov, sú uvedené v dodatku 2. V protokole by mali byť uvedené aj údaje o toxicite a klinických príznakoch.

Kritériá prijateľnosti

Prijateľnosť skúšky je založená na týchto kritériách:

a) súbežná negatívna kontrola sa považuje za prijateľnú a môže sa doplniť do databázy historických údajov z negatívnych kontrol laboratória, ako je opísané v bode 16,

▼M7

b) súbežné pozitívne kontroly (pozri bod 29) by mali vyvolať odozvy, ktoré sú zlučiteľné s odozvami získanými v databáze historických údajov z pozitívnych kontrol a v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou predstavujú štatisticky významný nárast,

c) bol analyzovaný adekvátny počet buniek a dávok (bod 52 a body 36 – 38),

d) kritériá výberu najvyššej dávky sú v súlade s kritériami opísanými v bode 36.

Hodnotenie a interpretácia výsledkov

Za predpokladu, že boli splnené všetky kritériá prijateľnosti sa testovaná chemikália považuje za jednoznačne pozitívnu, ak:

a) najmenej jedna z testovaných dávok vykazuje štatisticky významný nárast v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

b) ide o nárast, ktorý pri hodnotení vhodnou analýzou trendu potvrdí súvislosť s dávkou,

c) ktorýkoľvek z výsledkov je mimo distribúcie historických údajov o negatívnych kontrolách pre daný druh, nosič, spôsob (cestu), tkanivo a počet podaní.

Keď sú všetky tieto kritériá splnené, testovaná chemikália sa považuje za schopnú spôsobovať zlomy v reťazcoch DNA tkanív skúmaných týmto testovacím systémom. Ak je splnené iba jedno či dve z týchto kritérií, pozri bod 62.

Za predpokladu, že boli splnené všetky kritériá prijateľnosti sa testovaná chemikália považuje za jednoznačne negatívnu, ak:

a) ani jedna z testovaných koncentrácií nevykazuje štatisticky významný nárast v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

b) ide o nárast, ktorý pri hodnotení vhodnou analýzou trendu nepotvrdí súvislosť s koncentráciou,

c) všetky výsledky sú v rámci distribúcie historických údajov o negatívnych kontrolách pre daný druh, nosič, spôsob (cestu), tkanivo a počet podaní,

d) boli preukázané priame alebo nepriame dôkazy podporujúce expozíciu cieľového tkaniva, resp. tkanív, alebo ich toxicitu.

V tom prípade sa testovaná chemikália považuje za neschopnú spôsobovať zlomy v reťazcoch DNA tkanív skúmaných týmto testovacím systémom.

Neexistuje požiadavka na potvrdenie jednoznačne pozitívnej alebo negatívnej odozvy.

Ak odozva nie je ani jednoznačne negatívna, ani jednoznačne pozitívna (t. j. neboli splnené všetky kritériá uvedené v bodoch 59 a 60), v snahe napomôcť dosiahnutiu biologickej relevantnosti výsledku by sa mali údaje vyhodnocovať na základe odborného posudku a/alebo, ak je to vedecky opodstatnené, uskutočniť ďalšie skúmania. Užitočné môže byť aj hodnotenie dodatočných buniek (ak je to vhodné) alebo zopakovanie pokusu najlepšie po optimalizácii experimentálnych podmienok (napr. intervalov dávok, iných spôsobov podania, iných časov odberu vzoriek alebo iných tkanív).

V zriedkavých prípadoch, dokonca aj po ďalších skúmaniach, nemusí byť na základe daného súboru údajov možné dospieť k záveru o pozitívnych alebo negatívnych výsledkoch, a preto sa takéto údaje považujú za nejednoznačné.

▼M7

Posúdenie biologickej relevantnosti pozitívneho alebo nejednoznačného výsledku, ako aj informácie o cytotoxicite v cieľovom tkanive, sú povinné (pozri body 54 – 55). Ak sú pozitívne alebo nejednoznačné nálezy pozorované iba za prítomnosti jasných dôkazov cytotoxicity, štúdia by sa mala uzavrieť ako genotoxicky nejednoznačná, pokiaľ neexistuje dostatok informácií, ktoré podporujú konečný záver. V prípadoch negatívneho výsledku štúdie, ktoré svedčia o znakoch toxicity pri všetkých testovaných dávkach, môže byť vhodné vykonať ďalšiu štúdiu s netoxickými dávkami.

Skúšobný protokol

Skúšobný protokol by mal obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— zdroj, číslo dávky, ak je k dispozícii,

— stabilita testovanej chemikálie, konečný dátum použitia alebo dátum opätovnej analýzy, ak sú známe.

Jednozložková látka:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie napr. názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt pozorované a ak je to prakticky uskutočniteľné atď.

Viaczložková látka, UVCB a zmes:

— pokiaľ možno charakterizácia chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a relevantných fyzikálno-chemických vlastností zložiek,

Rozpúšťadlo/nosič:

— zdôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa,

— opis prípravy zloženia dávok,

— analytické určenie zložení (napr. stabilita, homogénnosť, nominálne koncentrácie).

Testované zvieratá:

— použitý druh/kmeň a vedecké a etické odôvodnenie ich výberu,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky umiestnenia, potrava, stimulujúce prostredie atď.,

— hmotnosť jednotlivých zvierat na začiatku a konci testu vrátane rozpätia telesnej hmotnosti, priemeru a štandardnej odchýlky pre každú skupinu.

Podmienky testu:

— údaje o pozitívnych a negatívnych (rozpúšťadlo/nosič) kontrolách;

▼M7

— výsledky štúdie na zistenie rozsahu (ak bola uskutočnená),

— odôvodnenie výberu veľkosti dávky,

— podrobné údaje o príprave testovanej chemikálie,

— podrobné údaje o podávaní testovanej chemikálie,

— odôvodnenie spôsobu (cesty) podania,

— miesto vpichu (v prípade podkožných alebo intravenóznych štúdií),

— metódy prípravy vzoriek, ak sú k dispozícii, histopatologických analýz, najmä v prípade chemikálie, ktorá vyvolá pozitívnu kométovú odozvu,

— odôvodnenie výberu tkaniva,

— metódy overovania, či sa testovaná chemikália dostala do cieľového tkaniva alebo hlavného obehu v prípade negatívnych výsledkov,

— skutočná dávka (mg/kg telesnej hmotnosti/deň) testovanej chemikálie vypočítaná z potravy/pitnej vody,

— v uplatniteľnom prípade koncentrácia (v ppm) a spotreba,

— podrobné údaje o kvalite potravy a vody,

— podrobný opis harmonogramov ovplyvňovania a odoberania vzoriek a odôvodnenie ich výberu (napr. toxikokinetické údaje, ak existujú),

— metóda zmierňovania bolesti, analgézia,

— metóda usmrtenia;

— postupy izolácie a uchovávania tkanív;

— metódy prípravy jednobunkových/jadrových suspenzií,

— zdroj a čísla dávok všetkých činidiel (ak je to možné),

— metódy hodnotenia cytotoxicity,

— podmienky elektroforézy,

— techniky zafarbenia a metódy hodnotenia a merania komét.

Výsledky:

— všeobecné klinické pozorovania každého zvieraťa pred a počas obdobia testovania, ak sa vykonávalo,

— dôkazy o cytotoxicite, ak bola vyvolaná,

▼M7

— v prípade štúdií trvajúcich viac ako jeden týždeň: hmotnosť jednotlivých zvierat v priebehu štúdie vrátane rozpätia telesnej hmotnosti, priemeru a štandardnej odchýlky pre každú skupinu, spotreba potravy,

— vzťah medzi dávkou a odozvou, ak evidentne existuje,

— pre každé tkanivo/zviera: % chvostovej DNA (alebo iné merania, ak sa zvolili) a stredné hodnoty za preparát, priemerné hodnoty za zviera a priemerné hodnoty za skupinu,

— súbežné a historické údaje o negatívnych kontrolách s rozsahmi, priemermi/strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami pri každom posudzovanom tkanive,

— súbežné a historické údaje o pozitívnych kontrolách,

— pre tkanivá iné ako pečeň: krivka závislosti odozvy od dávky pri pozitívnej kontrole. Môže ísť o údaje zozbierané počas preukazovania spôsobilosti (pozri body 16 a 17) doplnené príslušným odôvodnením, odkazmi na súčasnú odbornú literatúru a primerané sile a rozptylu odoziev na kontroly v danom tkanive;

— použité štatistické analýzy a metódy, kritériá hodnotenia odoziev ako pozitívnych, negatívnych alebo nejednoznačných,

— frekvencia výskytu „ježov“ v každej skupine a za zviera.

Rozbor výsledkov

Záver

Odkazy

LITERATÚRA

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. Kapitola B.8 tejto prílohy: *Subakútna inhalačná toxicita: 28-dňová štúdia*.

51. Kapitola B.29 tejto prílohy: *Subchronická inhalačná toxicita: 90-dňová štúdia*.

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

Dodatok 1

DEFINÍCIE

Alkalická jednobunková gélová elektroforéza: senzitívna technika detekcie primárneho poškodenia DNA na úrovni jednotlivých buniek/jadier.

Chemikália: látka alebo zmes.

Kométa: tvar podobný kométam, ktorý nadobudnú nukleoidy po tom, ako sa vložia do elektroforézneho poľa: hlavu tvorí jadro a chvost vznikne migráciou DNA z jadra pod vplyvom elektrického poľa.

Kritická premenná/kritický parameter: ide o protokolovú premennú, v prípade ktorej môže aj nepatrná zmena výrazne ovplyvniť záver skúšky. Kritické premenné môžu byť viazané na konkrétne tkanivo. Kritické premenné by sa nemali meniť, najmä v rámci testu bez toho, aby sa zvážilo, do akej miery ich zmena ovplyvní odozvu na test napr. na základe sily a variability pozitívnych a negatívnych kontrol. V skúšobnom protokole by mal byť uvedený zoznam zmien kritických premenných vykonaných počas testu alebo v porovnaní so štandardným laboratórnym protokolom spolu s odôvodneniami každej zmeny.

Hustota na chvoste alebo % chvostovej DNA: Ide o hustotu na chvoste kométy v porovnaní s celkovou hustotou (hlava plus chvost). Vyjadruje percentuálne množstvo zlomov DNA.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná touto testovacou metódou.

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

▼M7

Dodatok 2

FAKTORIÁLNY EXPERIMENT IDENTIFIKÁCIE ROZDIELOV MEDZI POHLAVIAMI V KOMÉTOVOM TESTE *IN VIVO*

Faktoriálny experiment a jeho analýza

Pri tomto experimente sa testuje minimálne 5 samcov a 5 samíc pri každej úrovni koncentrácie, čo znamená model s použitím minimálne 40 zvierat (20 samcov a 20 samičiek, plus príslušné pozitívne kontroly).

Tento model je jedným z jednoduchších faktoriálnych experimentov a zodpovedá dvojsmernej analýze rozptylu, ktorá má dva zásadné vplyvy, a to na pohlavie a úroveň koncentrácie. Údaje možno analyzovať použitím štandardných štatistických softvérových balíkov napr. SPPS, SAS, STATA, Genstat, ako aj pomocou programu R.

Touto analýzou sa variabilita súboru údajov rozdelí na variabilitu medzi pohlaviami, medzi koncentráciami a na variabilitu súvisiacu s interakciou medzi pohlaviami a koncentráciami. Každý z týchto znakov sa testuje v porovnaní s odhadom variability medzi paralelnými zvieratami (replikátmi) v rámci skupín zvierat rovnakého pohlavia pri rovnakej koncentrácii. Podrobné informácie o príslušnej metodike sú dostupné v mnohých bežných štatistických publikáciách (pozri odkazy) a v príručkách ku štatistickým programom.

Analýza začína kontrolou znaku interakcie pohlavia a koncentrácie v tabuľke ANOVA ([1]). Pri absencii významného znaku interakcie sú kombinované hodnoty naprieč pohlaviami alebo úrovňami koncentrácií validnými štatistickými testami variability medzi jednotlivými úrovňami, ktoré sú založené na skúmaní kumulovaného znaku variability v rámci skupiny analýzou ANOVA.

Analýza pokračuje rozdelením odhadu variability medzi koncentrácie podľa kontrastov, čo vedie k testovaniu lineárnych a kvadratických kontrastov odoziev naprieč úrovňami koncentrácií. Ak dôjde k významnej interakcii pohlavia a koncentrácie, tento znak možno takisto ďalej rozdeliť na porovnanie interakcií lineárnosti a pohlavia, ako aj kvadratickej interakcie a pohlavia. Tieto znaky vedú k testom, ktoré preukážu, či sú odozvy na koncentrácie paralelné u oboch pohlaví, alebo či obe pohlavia vykazujú odlišné odozvy.

Odhad kumulovanej variability v rámci skupiny možno použiť na párové testovanie rozdielov medzi priemernými hodnotami. Tieto porovnania by sa dali urobiť medzi priemernými hodnotami z oboch pohlaví a medzi priemermi za jednotlivú úroveň koncentrácie, ako sú napríklad porovnania s úrovňami pri negatívnych kontrolách. Ak existujú prípady významnej interakcie, je možné porovnávať priemery rozličných koncentrácií v rámci pohlavia alebo priemery za jednotlivé pohlavia pri rovnakej koncentrácii.

Odkazy

Existuje mnoho štatistických publikácií, ktoré rozoberajú teóriu, model, metodiku, analýzu a interpretáciu faktoriálnych experimentov, od tých najjednoduchších dvojfaktorových analýz k tým zložitejším, ktoré sú opísané v publikácii „*Design of Experiment methodology*“ (Model experimentálnej metodiky). Tento zoznam nie je úplný. V niektorých knihách sú uvedené vypracované príklady porovnateľných modelov, v niektorých prípadoch s kódom na vykonanie analýzy pomocou rozličných softvérových programov.

([1]) Štatistici používajúci metódu modelovania, akou sú napríklad všeobecné lineárne modely (*General Linear Model* – GLM), môžu pristupovať k analýze iným, no porovnateľným spôsobom, hoci nemusia nevyhnutne vypracovať tradičnú tabuľku ANOVA, ktorej pôvod siaha k algoritmickým prístupom používaným na výpočet štatistických údajov z obdobia pred nástupom počítačov.

▼**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

Dodatok 3

EXISTUJÚCE OBMEDZENIA SKÚŠKY

Na základe súčasných poznatkov je v súvislosti s kométovým testom *in vivo* známych niekoľko obmedzení. Očakáva sa, že ich počet sa bude znižovať, príp. sa s pribúdajúcimi skúsenosťami s používaním testu presnejšie zadefinujú tak, aby bolo možné zodpovedať bezpečnostné otázky z hľadiska predpisov.

1. Niektoré typy poškodenia DNA môžu byť krátkodobé, t. j. môžu sa opraviť príliš rýchlo na to, aby sa po 24 hodinách či viac od poslednej dávky dali pozorovať. Neexistuje konkrétny zoznam s typmi krátkodobých poškodení ani s chemikáliami, ktoré môžu tento typ poškodenia spôsobovať, ba dokonca nie je ani známe, za aký čas možno tento druh poškodení zistiť. Optimálny čas, resp. časy odberu vzoriek môžu byť takisto závislé od chemikálie alebo spôsobu jej podania, pričom časy odberu vzoriek by sa mali určovať na základe kinetických údajov (napríklad čas T_{max}, za ktorý sa dosiahne hodnota najintenzívnejšej koncentrácie v plazme alebo tkanive), ak sú takéto údaje dostupné. Vo väčšine validačných štúdií podporujúcich túto testovaciu metódu sa uvádza vykonanie pitvy 2 alebo 3 hodiny po podaní konečnej dávky. Väčšina štúdií publikovaných v odbornej literatúre opisuje podanie konečnej dávky medzi 2 až 6 hodinami pred utratením. Preto boli tieto poznatky použité ako základ pre odporúčanie v rámci tejto testovacej metódy, na základe ktorého by sa pri absencii údajov nenaznačujúcich pravý opak, mala konečná dávka podať v určenom časovom intervale medzi 2 a 6 hodinami pred pitvou.

2. Neexistuje žiadna štúdia s identifikovateľnými údajmi, ktorá by skúmala citlivosť testu na zistenie krátkodobých poškodení DNA po podaní chemikálie potravou alebo pitnou vodou v porovnaní s jej podaním cez sondu. Bolo zistené poškodenie DNA po podaní v krmivách a pitnej vode, ale v porovnaní s ďaleko väčšími skúsenosťami s podávaním cez sondu a intraperitoneálnou injekciou ide len o relatívne malý počet týchto správ. Preto môže byť citlivosť tohto testu v prípade chemikálií spôsobujúcich krátkodobé poškodenia, ktoré sú podávané v krmivách alebo pitnej vode, znížená.

3. Neboli vykonané žiadne iné medzilaboratórne štúdie ako štúdie tkanív pečene a žalúdka, a preto neexistujú žiadne odporúčania, ako dosiahnuť citlivú a reprodukovateľnú odozvu v iných tkanivách ako tkanive pečene, ako sú napríklad očakávané rozsahy pozitívnych a negatívnych kontrol. Ani v prípade pečene sa však nepodarilo dosiahnuť dohodu o stanovení dolnej hranice negatívnej kontroly.

4. Napriek tomu, že existuje niekoľko publikácií dokazujúcich nejednoznačný účinok cytotoxicity *in vitro*, bolo uverejnených len veľmi málo údajov *in vivo*, a preto nie je možné odporučiť jediné meranie cytotoxicity. Hoci sú so zvýšením migrácie DNA spájané histopatologické zmeny ako zápal, bunková infiltrácia, apoptózové alebo nekrotické zmeny, nemusia vždy vyústiť do pozitívnych nálezov komét, čo potvrdila aj validačná skúška JaCVAM (OECD, 2014), a preto neexistuje žiadny konečný zoznam histopatologických zmien, ktoré by súviseli iba so zvýšenou migráciou DNA. „Ježe“ (*hedgehogs*, *clouds*, *ghost cells*) boli pôvodne navrhnuté ako ukazovatele cytotoxicity, ich etiológia je však nejasná. Existujú údaje, ktoré naznačujú, že ich môže spôsobovať cytotoxicita súvisiaca s chemikáliou, mechanicky/enzymaticky indukované poškodenia, ktoré vznikajú vo fáze prípravy vzorky (Guerard *et al.*, 2014), a/alebo extrémnejší účinok genotoxicity testovanej chemikálie. Z iných údajov vyplýva, že vznikajú z dôvodu rozsiahleho, no pravdepodobne opraviteľného poškodenia DNA (Lorenzo *et al.*, 2013).

▼**M7**

5. Tkanivá alebo bunkové jadrá možno úspešne zmraziť na účely ďalšej analýzy. To obyčajne umožní zmerať reakciu na nosič a pozitívnu kontrolu ((Recio *et al.*, 2010; Recio *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2013). V prípade ich použitia by laboratórium malo preukázať schopnosť používať metódy zmrazovania a potvrdiť prijateľné nízke rozsahy % chvostovej DNA v cieľových tkanivách zvierat ošetrených nosičom, ako aj skutočnosť, že pozitívne reakcie je možné naďalej pozorovať. V odbornej literatúre boli opísané rôzne metódy zmrazovania tkanív. V súčasnosti však neexistuje žiadna dohoda o tom, ako tkanivá čo najlepšie zmrazovať a rozmrazovať a akým spôsobom posúdiť, či potenciálna odchýlka reakcie dokáže ovplyvniť citlivosť skúšky.

6. Z nedávnych prác je zrejmé, že zoznam kritických premenných sa podľa všetkého zúži a parametre kritických premenných budú presnejšie definované (Guerard *et al.*, 2014).

Odkazy

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. SKRÍNINGOVÝ TEST REPRODUKČNEJ/VÝVOJOVEJ TOXICITY

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 421 (2016). Usmernenia OECD na testovanie chemikálií sa pravidelne revidujú vzhľadom na vedecký pokrok. Pôvodné usmernenie 421 na vykonávanie skríningových testov bolo prijaté v roku 1995 na základe protokolu pre „Predbežný skríningový test reprodukčnej toxicity“, o ktorom sa diskutovalo na dvoch stretnutiach odborníkov, a to v Londýne v roku 1990 (1) a v Tokiu v roku 1992 (2).

2. Táto testovacia metóda bola doplnená o príslušné sledované parametre endokrinných disruptorov, a to v nadväznosti na činnosť s vysokou prioritou, ktorú začala OECD v roku 1998 s cieľom zrevidovať existujúce usmernenia na vykonávanie testov a vypracovať nové usmernenia na vykonávanie testov na skríning a testovanie potenciálnych endokrinných disruptorov (3). Napríklad usmernenie OECD TG 407 (28-dňová štúdia orálnej toxicity po opakovaných dávkach pri hlodavcoch, kapitola B.7 tejto prílohy) bolo v roku 2008 rozšírené o parametre vhodné na zistenie endokrinného pôsobenia testovaných chemikálií. Cieľom aktualizácie TG 421 bolo zahrnúť niektoré príslušné sledované parametre endokrinných disruptorov do TG týkajúcich sa skríningu, kde časy expozície zahŕňajú niektoré z citlivých období počas vývoja (prenatálne alebo skoré postnatálne obdobie).

3. Tieto vybrané dodatočné príslušné sledované parametre endokrinných disruptorov, ktoré sú zároveň súčasťou TG 443 (Rozšírená jednogeneračná štúdia reprodukčnej toxicity, kapitola B.56 tejto prílohy) boli zahrnuté do TG 421 na základe štúdie uskutočniteľnosti, ktorá sa týkala vedeckých a technických otázok súvisiacich s ich zaradením, ako aj možných úprav koncepcie testu potrebných na ich zaradenie (4).

4. Táto testovacia metóda je navrhnutá tak, aby sa v nej generovali obmedzené informácie týkajúce sa účinkov testovanej chemikálie na samčiu a samičiu reprodukčnú schopnosť, ako sú funkcie pohlavných žliaz, rozmnožovacie správanie, počatie, vývoj zárodku a pôrod. Nie je alternatívou k existujúcim testovacím metódam B.31, B.34, B.35 alebo B.56, ani ich nenahrádza.

POČIATOČNÉ ÚVAHY

5. Táto skríningová testovacia metóda sa môže použiť na poskytnutie počiatočných informácií o možných účinkoch na reprodukciu a/alebo vývoj v skorom štádiu posudzovania toxikologických vlastností chemikálií, alebo informácií o predmetných chemikáliách. Môže sa použiť aj ako súčasť súboru počiatočných skríningových testov pri existujúcich chemikáliách, o ktorých je k dispozícii len málo toxikologických informácií alebo nie sú k dispozícii žiadne toxikologické informácie, ako štúdia na zistenie rozsahu dávok pri rozsiahlejších štúdiách o reprodukcii/vývoji, alebo ak sa to inak považuje za relevantné. Pri vykonávaní štúdie je potrebné sa riadiť zásadami a hľadiskami uvedenými v usmerňovacom dokumente OECD č. 19 o uznávaní, posudzovaní a používaní klinických príznakov ako sledovaných parametrov u ľudí v prípade pokusných zvierat používaných pri hodnotení bezpečnosti (5).

▼M8

6. Táto testovacia metóda neposkytuje úplné informácie o všetkých aspektoch reprodukcie a vývoja. Predovšetkým ponúka len obmedzené prostriedky na zistenie postnatálnych prejavov prenatálnej expozície alebo na zistenie účinkov, ktoré môžu byť vyvolané počas postnatálnej expozície. V dôsledku (okrem iných dôvodov) pomerne malého počtu zvierat v dávkových skupinách, selektívnosti sledovaných parametrov a krátkeho trvania štúdie táto metóda neposkytuje dôkazy na podloženie konečných záverov o neexistencii účinkov. Okrem toho, ak neexistujú údaje z iných testov reprodukčnej/vývojovej toxicity, pozitívne výsledky sú užitočné pri počiatočnom posúdení nebezpečnosti a prispievajú k rozhodnutiam, pokiaľ ide o potrebu a načasovanie ďalšieho testovania.

7. Výsledky získané pomocou parametrov súvisiacich s endokrinným systémom by sa mali posudzovať v kontexte „Koncepčného rámca OECD na testovanie a hodnotenie chemikálií poškodzujúcich endokrinný systém“ (6). V tomto koncepčnom rámci je rozšírené usmernenie OECD TG 421 obsiahnuté na úrovni 4 ako skúška *in vivo* poskytujúca údaje o nežiaducich účinkoch na príslušné sledované parametre endokrinného systému. Signál endokrinného systému sa však sám osebe nemusí považovať za dostatočný dôkaz, že testovaná chemikália je endokrinným disruptorom.

8. Pri tejto testovacej metóde sa testovaná chemikália podáva orálne. Ak sa použijú iné spôsoby expozície, môžu sa vyžadovať úpravy.

9. Pred použitím tejto testovacej metódy na zmesi s cieľom generovať údaje plánované na regulačné účely by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na tento účel, a ak áno, tak prečo. Takéto úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi.

10. Vymedzenie použitých pojmov sa uvádza v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

11. Testovaná chemikália sa podáva viacerým skupinám samčích a samičích pokusných zvierat v odstupňovaných dávkach. Samcom by sa mali dávky podávať najmenej štyri týždne a až do dňa pred naplánovaným usmrtením vrátane tohto dňa (to znamená minimálne dva týždne pred párením, počas obdobia párenia a približne dva týždne po párení). Vzhľadom na obmedzené obdobie podávania dávok pred párením pri samcoch nemôže plodnosť predstavovať osobitný citlivý ukazovateľ testikulárnej toxicity. Z toho dôvodu je dôležité podrobné histologické vyšetrenie semenníkov. Na zistenie väčšiny účinkov na samčiu plodnosť a spermatogenézu sa za dostatočnú kombináciu považuje spojenie dvojtýždňového obdobia podávania dávok pred párením a následných pozorovaní párenia/plodnosti s najmenej štvortýždňovým celkovým obdobím podávania dávok, po ktorom nasleduje podrobná histopatológia samčích pohlavných žliaz.

12. Samiciam by sa mali podávať dávky počas celej štúdie. To zahŕňa dva týždne pred párením (s cieľom pokryť aspoň dva úplné estrálne cykly), variabilný čas do počatia, trvanie gravidity a najmenej trinásť dní po pôrode až do dňa pred naplánovaným usmrtením vrátane tohto dňa.

13. Trvanie štúdie – po aklimatizácii a vyhodnotení estrálneho cyklu pred začatím podávania dávok – závisí od stavu samice a má dĺžku približne 63 dní [najmenej 14 dní pred obdobím párenia, (do) 14 dní obdobia párenia, 22 dní gravidity, 13 dní laktácie].

▼M8

14. Počas obdobia podávania sa zvieratá dôkladne pozorujú, pričom sa denne kontroluje prítomnosť toxických príznakov. Pitva sa uskutoční na zvieratách uhynutých alebo usmrtených počas obdobia testovania, ako aj po ukončení testu na zvieratách, ktoré test prežijú.

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

15. Táto testovacia metóda je určená na použitie s potkanmi. Ak sa parametre uvedené v rámci tejto testovacej metódy skúmajú pri inom druhu hlodavcov, je potrebné uviesť podrobné odôvodnenie. V rámci medzinárodného programu overovania na zistenie endokrinných disruptorov v usmernení OECD TG 407 (ktoré zodpovedá kapitole B.7 tejto prílohy) sa použili iba potkany. Kmene s nízkou plodnosťou alebo kmene, o ktorých je známe, že majú vysoký výskyt vývojových porúch, by sa nemali používať. Mali by byť použité zdravé panenské zvieratá, ktoré dosiaľ neboli predmetom žiadnych testov. Pokusné zvieratá by mali byť charakterizované, pokiaľ ide o druh, kmeň, pohlavie, hmotnosť a vek. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variabilita použitých zvierat minimálna a nemala by presiahnuť 20 % strednej hmotnosti každého pohlavia. Ak sa táto štúdia uskutočňuje ako predbežná štúdia k dlhodobej alebo celogeneračnej štúdii, je lepšie v oboch štúdiách použiť zvieratá toho istého druhu a z toho istého zdroja.

Umiestnenie a kŕmenie

16. Všetky postupy musia byť v súlade s miestnymi normami starostlivosti o laboratórne zvieratá. Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C (±3 °). Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 % a pokiaľ možno, okrem obdobia počas čistenia miestnosti, by nemala prevyšovať 70 %, cieľová relatívna vlhkosť by mala byť 50 – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej chemikálie, keď sa podáva týmto spôsobom.

17. Zvieratá by mali byť umiestnené spolu v malých skupinách rovnakého pohlavia. Ak je to vedecky opodstatnené, zvieratá môžu byť umiestnené samostatne. Pokiaľ ide o umiestnenie skupín do klietok, v jednej klietke by nemalo byť viac ako päť zvierat. Párenie sa uskutoční v klietkach, ktoré sú vhodné na tento účel. Gravidné samice by mali byť jednotlivo umiestnené do klietok a mal by sa im poskytnúť materiál na tvorbu hniezda. Samice v laktácii sa jednotlivo umiestnia do klietok so svojím potomstvom.

18. Krmivo treba pravidelne analyzovať, aby sa zistilo, či neobsahuje kontaminanty. Vzorka krmiva by sa mala zachovať až do dokončenia správy.

Príprava zvierat

19. Zdravé, mladé, dospelé zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy spôsobené ich umiestnením. Zvieratá sa jednotlivo označia. Zvieratá sa v klietkach aklimatizujú na laboratórne podmienky najmenej päť dní pred začatím štúdie.

Príprava dávok

20. Odporúča sa, aby sa testovaná chemikália podávala orálne, pokiaľ sa iná cesta podania nepokladá za vhodnejšiu. Keď sa zvolí orálna cesta, testovaná chemikália sa obvykle podáva sondou. Alternatívne sa však testované chemikálie môžu podávať v krmive alebo pitnej vode.

▼M8

21. V prípade potreby sa testovaná chemikália rozpustí alebo suspenduje vo vhodnom nosiči. Odporúča sa, aby sa vždy, keď je to možné, najskôr zvážilo použitie vodného roztoku/suspenzie, potom roztoku/emulzie v oleji (napr. v kukuričnom oleji) a nakoniec použitie prípadného roztoku v iných nosičoch. Pre iné nosiče ako voda majú byť známe toxické vlastnosti nosiča. Mala by sa určiť stabilita a homogenita testovanej chemikálie v nosiči.

POSTUP

Počet zvierat a ich pohlavie

22. Odporúča sa, aby každá skupina začala najmenej s 10 samcami a 12 – 13 samicami. Pri samiciach sa pred expozíciou vyhodnotí estrálny cyklus a zvieratá, ktoré nevykazujú príznačné 4 – 5-dňové cykly, nebudú zaradené do štúdie. Preto sa odporúča viac samíc, aby na skupinu pripadalo 10 samíc. Očakáva sa, s výnimkou prípadov výrazných toxických účinkov, že takto sa dosiahne počet najmenej 8 gravidných samíc na skupinu, čo je obvykle minimálny prijateľný počet gravidných samíc na skupinu. Cieľom je dosiahnuť dostatočný počet gravidných samíc a potomkov, aby sa zabezpečilo zmysluplné hodnotenie potenciálu testovanej chemikálie pôsobiť na plodnosť, graviditu, materské a dojčenské správanie, ako aj na rast a vývoj potomstva generácie F_1 od počatia po 13. deň po pôrode.

Dávkovanie

23. Bežne sa používajú tri testované skupiny a jedna kontrolná skupina. Úrovne dávok môžu vychádzať z informácií z testov akútnej toxicity alebo z výsledkov štúdií s opakovanou dávkou. So zvieratami v kontrolnej skupine sa musí zaobchádzať takisto ako so zvieratami v testovaných skupinách, s výnimkou aplikovania testovanej chemikálie. Ak sa pri podávaní testovanej chemikálie používa nosič, kontrolná skupina dostane nosič v najvyššom používanom objeme.

24. Pri výbere úrovní dávok by sa mali brať do úvahy existujúce údaje o toxicite a (toxiko-) kinetike. Okrem toho by sa malo vziať do úvahy, že môžu existovať rozdiely v citlivosti medzi gravidnými a negravidnými samicami. Najvyššia úroveň dávky sa vyberie tak, aby vyvolala toxické účinky, ale nespôsobila uhynutie zvierat ani vážne utrpenie. Potom sa klesajúca postupnosť úrovní dávok zvolí tak, aby sa preukázala každá odozva na dávku a stanovila sa hladina bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL) pri najnižšej úrovni dávky. Pri stanovení klesajúcich úrovní dávok sú často optimálne intervaly predstavujúce dvoj- až štvornásobok, pričom pridanie štvrtej testovanej skupiny je často vhodnejšie než použitie veľmi veľkých intervalov medzi dávkami (napr. viac než 10-násobku).

25. Ak sa pozoruje všeobecná toxicita (napr. zníženie telesnej hmotnosti, účinky na pečeň, srdce, pľúca alebo obličky atď.) alebo iné zmeny, ktoré nemusia byť toxikologickou reakciou (napr. nižší príjem potravy, zväčšenie pečene), pri interpretácii pozorovaných účinkov na endokrinné citlivé sledované parametre je potrebné postupovať obozretne.

Limitný test

26. Ak sa v orálnej štúdii s jednou úrovňou dávky dosahujúcou minimálne 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň alebo, v prípade podávania v krmive alebo pitnej vode, pri rovnakom percentuálnom podiele v krmive alebo pitnej vode s použitím postupov opísaných pre túto štúdiu neprejavia žiadne pozorovateľné toxické účinky a ak sa vzhľadom na údaje o štrukturálne príbuzných látkach toxicita neočakáva, potom sa môže upustiť od úplnej štúdie zahŕňajúcej viaceré úrovne dávok. Limitný test sa neuplatňuje vtedy, keď z expozície ľudí vyplýva, že je potrebné použiť vyššiu orálnu dávku. V prípade iných ciest podania, napr. pri inhalácii alebo dermálnej aplikácii, môžu maximálnu dosiahnuteľnú koncentráciu často určovať fyzikálno-chemické vlastnosti testovaných chemikálií.

▼M8

Podávanie dávok

27. Zvieratám sa podáva testovaná chemikália každý deň, 7 dní v týždni. Ak je testovaná chemikália podávaná cez sondu, musí sa to realizovať v jednej dávke pre zviera s použitím žalúdočnej sondy alebo vhodnej intubačnej kanyly. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Objem nemá byť vyšší ako 1 ml/100 g telesnej hmotnosti, s výnimkou vodných roztokov, pri ktorých sa môže použiť objem 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. S výnimkou dráždivých alebo žieravých testovaných chemikálií, ktoré pri vyšších koncentráciách zvyčajne spôsobujú zhoršenie účinkov, by sa variabilita v aplikovanom objeme mala minimalizovať tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem pri všetkých úrovniach dávok.

28. V prípade podávania testovanej chemikálie v krmive alebo pitnej vode je dôležité zaistiť, aby množstvo obsiahnutej testovanej chemikálie nenarúšalo normálnu nutričnú alebo vodnú rovnováhu. Keď sa testovaná chemikália podáva v krmive, môže sa použiť buď stála koncentrácia v krmive (ppm), alebo stála úroveň dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvierat; iné možnosti by sa mali špecifikovať. V prípade podávania testovanej chemikálie pomocou sondy sa má príslušná dávka podávať každý deň približne v rovnakom čase a aspoň raz za týždeň sa upraví, aby sa zachovala stála úroveň dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvierat.

Harmonogram testu

29. Podávanie dávky obom pohlaviam by sa malo začať najmenej 2 týždne pred párením, pričom najskôr sa zvieratá najmenej päť dní aklimatizujú a vykoná sa skríning samíc na účely zistenia normálnych estrálnych cyklov (v 2-týždňovom období pred aplikáciou chemikálie). Štúdia by sa mala naplánovať tak, aby sa hodnotenie estrálneho cyklu začalo tesne po dosiahnutí úplnej pohlavnej zrelosti zvierat. To sa v prípade rôznych kmeňov potkanov v rôznych laboratóriách môže mierne líšiť, napr. pri potkanoch z kmeňa Sprague Dawley je to vo veku 10 týždňov a pri potkanoch z kmeňa Wistar približne vo veku 12 týždňov. Matky s potomstvom by mali byť usmrtené 13. deň po pôrode alebo krátko po tomto dni. Deň narodenia (t. j. deň ukončenia pôrodu) sa označuje ako deň 0 po pôrode. Samice, pri ktorých sa nezaznamená kopulácia, sú usmrtené 24 – 26 dní od posledného dňa obdobia párenia. Podávanie dávky pokračuje pri oboch pohlaviach počas obdobia párenia. Samcom sa dávka ďalej podáva po období párenia aspoň do skončenia minimálneho 28-dňového celkového obdobia podávania dávok. Potom sa usmrtia, prípadne sa uchovajú a naďalej sa im podáva dávka na účely možného druhého párenia, ak sa to považuje za vhodné.

30. Denné podávanie dávok rodičovským samiciam by malo pokračovať v priebehu gravidity a najmenej do 13. dňa (vrátane) po pôrode alebo do dňa pred usmrtením. V prípade štúdií, pri ktorých sa testovaná chemikália podáva inhaláciou alebo transdermálne, by podávanie dávky malo pokračovať najmenej do 19. dňa gravidity (vrátane) a podávanie dávky by sa malo čo najskôr obnoviť – najneskôr na 4. postnatálny deň.

31. Schéma harmonogramu testu je uvedená v dodatku 2.

Párenie

32. V tejto štúdii sa bežne používajú pomery párenia 1:1 (jeden samec a jedna samica). Výnimky sa môžu vyskytnúť v prípade príležitostných úmrtí samcov. Samica sa má nachádzať v prítomnosti toho istého samca, kým sa nezaznamená kopulácia alebo kým neuplynú dva týždne. Každé ráno sa samice vyšetria na prítomnosť spermy alebo vaginálnej zátky. Za 0. deň gravidity sa určí deň, keď sa potvrdí dôkaz o párení (zistí sa prítomnosť vaginálnej zátky alebo spermy). V prípade neúspešného párenia sa zváži opätovné párenie samíc so samcami z rovnakej skupiny s preukázanou plodnosťou.

▼M8

Veľkosť vrhu

33. Na 4. deň po narodení možno upraviť veľkosť jednotlivých vrhov odstránením prebytočných mláďat náhodným výberom, aby sa v čo najväčšej miere dosiahli vrhy so štyrmi alebo piatimi mláďatami z každého pohlavia v závislosti od bežnej veľkosti vrhu použitého kmeňa potkanov. Z dvoch prebytočných mláďat sa odoberú vzorky krvi, ktoré sa zlúčia a použijú na určenie hladín hormónu T4 v sére. Nie je vhodné selektívne odstraňovanie mláďat, napríklad na základe telesnej hmotnosti alebo anogenitálnej vzdialenosti (AGD). Ak vzhľadom na počet samčích alebo samičích mláďat nemožno dospieť k tomu, aby každý vrh tvorilo štyri až päť mláďat z každého pohlavia, je prijateľná čiastočná úprava (napríklad šesť samcov a štyri samice). Mláďatá sa neodstraňujú, ak by veľkosť vrhu klesla pod cieľovú hodnotu na utratenie (8 alebo 10 mláďat/vrh). Ak sa cieľová hodnota na utratenie prekročí len o jedno mláďa, odstráni sa len jedno mláďa, ktoré sa použije na odber krvi na prípadné vyšetrenia T4 v sére.

34. Ak sa veľkosť vrhu neupraví, 4. deň po narodení sa usmrtia dve mláďatá v každom vrhu a odoberú sa vzorky krvi na meranie koncentrácií hormónu štítnej žľazy v sére. Ak je to možné, uvedené dve mláďatá v každom vrhu by mali byť samice, aby bolo možné vyhradiť samčie mláďatá na vyhodnotenie vzniku retenčnej mliečnej cysty. Neplatí to však v prípade, keď by po odstránení týchto mláďat neostali žiadne samice na posúdenie po usmrtení. Mláďatá sa neodstraňujú, ak by veľkosť vrhu klesla pod 8 alebo 10 mláďat/vrh (v závislosti od bežnej veľkosti vrhu použitého kmeňa potkanov). Ak sa bežná veľkosť vrhu prekročí len o jedno mláďa, odstráni sa len jedno mláďa, ktoré sa použije na odber krvi na prípadné vyšetrenia T4 v sére.

Pozorovania počas života

Klinické pozorovania

35. Počas celého testovacieho obdobia sa najmenej raz denne vykonávajú všeobecné klinické pozorovania, pričom v prípade pozorovania toxických príznakov sa vykonávajú častejšie. Vykonávajú sa pokiaľ možno každý deň v rovnakom čase s prihliadnutím na obdobie, keď sa predpokladajú maximálne účinky po podaní dávky. Zaznamenávajú sa príslušné zmeny správania, príznaky ťažkého alebo dlhotrvajúceho pôrodu a všetky toxické príznaky vrátane úmrtnosti. Tieto záznamy by mali zahŕňať čas nástupu, stupeň a trvanie toxických príznakov.

Telesná hmotnosť a spotreba potravy/vody

36. Samce a samice sa odvážia v prvý deň podávania dávok, potom najmenej raz týždenne a následne pri usmrtení. Počas gravidity sa samice odvážia na 0., 7., 14. a 20. deň a do 24 hodín po pôrode (0. alebo 1. deň po pôrode) a najmenej na 4. a 13. deň po pôrode. Tieto zistenia sa zaznamenajú jednotlivo pre každé dospelé zviera.

37. Počas obdobia pred párením, obdobia gravidity a laktácie by sa mala aspoň raz za týždeň merať spotreba potravy. Meranie spotreby potravy počas párenia je voliteľné. Počas týchto období sa meria aj spotreba vody, ak sa testovaná chemikália podáva v pitnej vode.

Estrálne cykly

38. Estrálne cykly sa monitorujú pred začatím ošetrenia s cieľom vybrať do štúdie samice s pravidelnými cyklami (pozri odsek 22). Od začiatku obdobia ošetrenia až do zaznamenania párenia sa denne monitorujú aj vaginálne stery. Ak existujú obavy z akútnych stresových účinkov, ktoré by mohli zmeniť estrálne cykly po začatí podávania dávok, laboratóriá môžu použiť

▼M8

expozíciu pokusných zvierat počas 2 týždňov, potom denne odoberať vaginálne stery na monitorovanie estrálneho cyklu najmenej dva týždne počas obdobia pred párením a pokračovať s monitorovaním až do obdobia párenia, až kým sa nezaznamená párenie. Pri odbere vaginálnych/cervikálnych buniek je potrebné dbať na to, aby sa neporušila sliznica, čo by mohlo vyvolať pseudograviditu (7) (8).

Parametre potomstva

39. Trvanie gravidity sa zaznamená a počíta sa od jej 0. dňa. Každý vrh je potrebné čo najskôr po pôrode vyšetriť a stanoviť počet a pohlavie mláďat, mŕtvonarodených, živonarodených a nevyvinutých jedincov (mláďat, ktoré sú výrazne menšie než príslušné mláďatá z kontrolnej skupiny) a prítomnosť výrazných abnormalít.

40. Živé mláďatá sa spočítajú, určí sa ich pohlavie a do 24 hodín od pôrodu (na 0. alebo 1. deň po pôrode) a následne najmenej na 4. a 13. deň po pôrode sa určí ich telesná hmotnosť. Okrem pozorovaní uvedených v odseku 35 je potrebné zaznamenať akékoľvek abnormálne správanie potomstva.

41. V ten istý deň medzi 0. až 4. postnatálnym dňom sa zmeria anogenitálna vzdialenosť (AGD) každého mláďaťa. V deň merania AGD sa zisťuje aj telesná hmotnosť mláďaťa, pričom sa AGD štandardizuje na mieru veľkosti mláďaťa, najlepšie na tretiu odmocninu telesnej hmotnosti (9). Na 12. alebo 13. postnatálny deň sa určí počet bradaviek/areol pri samčích mláďatách, ako sa odporúča v usmerňovacom dokumente OECD č. 151 (10).

Klinická biochémia

42. Vzorky krvi sa odoberajú z určeného miesta na základe tohto harmonogramu:

— najmenej dvom mláďatám na vrh na 4. deň po narodení, ak to umožňuje počet mláďat (pozri odseky 33 – 34),

— všetkým matkám a najmenej dvom mláďatám na vrh pri usmrtení na 13. deň a

— všetkým dospelým samcom pri usmrtení.

Všetky vzorky krvi sa uchovávajú za vhodných podmienok. Vzorky krvi mláďat z 13. dňa a dospelých samcov sa posudzujú, pokiaľ ide o hladiny hormónov štítnej žľazy (T4) v sére. Ak je to relevantné, vykoná sa ďalšie posúdenie T4 vo vzorkách krvi matiek a mláďat zo 4. dňa. V relevantných prípadoch možno voliteľne vykonať meranie iných hormónov. Na účely analýzy hormónov štítnej žľazy možno krv mláďat zlúčiť v rámci vrhu. Hormóny štítnej žľazy (T4 a TSH) sa majú podľa možnosti merať ako celková hodnota.

43. Variabilitu a absolútne koncentrácie hormonálnych ukazovateľov môžu ovplyvniť tieto faktory:

— čas usmrtenia z dôvodu každodennej zmeny koncentrácií hormónov,

— metóda usmrtenia s cieľom zabrániť neprimeranému stresu pre zvieratá, ktorý môže ovplyvniť koncentrácie hormónov,

— súpravy na testovanie hormonálnych ukazovateľov, ktoré sa môžu líšiť štandardnými krivkami.

▼M8

44. Vzorky plazmy osobitne určené na stanovenie hladiny hormónov sa odoberú počas porovnateľných denných časov. Číselné hodnoty získané analýzou koncentrácií hormónov sa v prípade použitia rozličných komerčne dostupných testovacích súprav líšia.

Patológia

Makroskopická pitva

45. V čase usmrtenia alebo uhynutia počas štúdie sa dospelé zvieratá vyšetria makroskopicky na všetky abnormality alebo patologické zmeny. Osobitná pozornosť sa venuje orgánom reprodukčného systému. Je potrebné zaznamenať počet implantačných miest. Ráno v deň pitvy sa vyšetria vaginálne stery, aby sa určilo štádium estrálneho cyklu a umožnilo sa určenie korelácie s histopatológiou vaječníkov.

46. Semenníky a nadsemenníky, ako aj prostata a semenné mechúriky s koagulačnými žľazami ako celok všetkých dospelých zvierat sa podľa potreby zbavia priľahlých tkanív a čo najskôr po disekcii sa určí ich vlhká hmotnosť, kým orgány nevyschnú. Okrem toho možno voliteľne určiť hmotnosť orgánov, ako je komplex zdvíhača konečníka a bulbokavernóznych svalov, Cowperove žľazy a žaluď pri samcoch a párové vaječníky (vlhká hmotnosť) a maternica (vrátane krčka maternice) pri samiciach. V prípade zahrnutia týchto orgánov je potrebné určiť ich hmotnosť čo najskôr po disekcii.

47. Mŕtve mláďatá a mláďatá usmrtené na 13. deň po narodení alebo krátko po tomto dni je potrebné prinajmenšom dôkladne preskúmať zvonku na účely zistenia výrazných abnormalít. Je potrebné venovať osobitnú pozornosť vonkajším reprodukčným pohlavným orgánom, ktoré by sa mali vyšetriť na príznaky zmien vo vývoji. Na 13. deň sa uchová štítna žľaza z 1 samčieho a 1 samičieho mláďaťa z každého vrhu.

48. Uchovajú sa vaječníky, semenníky, akcesórne pohlavné orgány (maternica a krčok maternice, nadsemenníky, prostata, semenné mechúriky s koagulačnými žľazami), štítna žľaza a všetky orgány, ktoré majú makroskopické lézie, všetkých dospelých zvierat. Na rutinné vyšetrenie semenníkov a nadsemenníkov sa neodporúča fixácia formalínom. Prijateľnou metódou pre tieto tkanivá je použitie Bouinovho fixačného prostriedku alebo modifikovaného Davidsonovho fixačného prostriedku (11). Obal *tunica albuginea* sa môže opatrne a plytko prepichnúť ihlou na oboch stranách orgánu, aby sa umožnilo rýchle napustenie fixačným prostriedkom.

Histopatológia

49. Vykoná sa podrobné histologické vyšetrenie vaječníkov, semenníkov a nadsemenníkov (s osobitným dôrazom na štádiá spermatogenézy a histopatológiu štruktúry intersticiálnych buniek semenníkov) zvierat v skupine s najvyššou dávkou a v kontrolnej skupine. Podľa potreby možno vyšetriť aj ostatné uchované orgány vrátane štítnej žľazy mláďat a dospelých zvierat. Hmotnosť štítnej žľazy sa môže určiť po fixácii. Orezanie je potrebné vykonať veľmi opatrne a až po fixácii, aby sa predišlo poškodeniu tkaniva. Poškodenie tkaniva by mohlo ohroziť histopatologickú analýzu. Ak sa zistia zmeny v skupine s najvyššou dávkou, tieto vyšetrenia sa aplikujú aj pri zvieratách zo skupín s odlišnou úrovňou dávok. V usmernení o histopatológii (11) sa uvádzajú ďalšie podrobnosti o disekcii, fixácii, vykonávaní rezov a histopatológii endokrinných tkanív.

▼M8

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje

50. Uvádzajú sa údaje o jednotlivých zvieratách. Okrem toho sa všetky údaje zhrnú v tabuľkovej podobe, kde sa pre každú pokusnú skupinu uvedie počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu alebo boli usmrtené z humánnych dôvodov, čas každého úmrtia alebo usmrtenia, počet plodných zvierat, počet gravidných samíc, počet zvierat vykazujúcich toxické príznaky, opis zistených príznakov toxicity vrátane času nástupu, trvania a závažnosti každého toxického účinku, typy histopatologických zmien a všetky relevantné údaje, ktoré sa týkajú vrhu. Formát súhrnnej správy v tabuľkovej podobe, ktorý sa ukázal ako veľmi užitočný na hodnotenie reprodukčného/vývojového účinku, sa uvádza v dodatku 3.

51. Vzhľadom na obmedzené rozmery štúdie majú štatistické analýzy vo forme testov „významnosti“ obmedzenú hodnotu v prípade mnohých sledovaných parametrov, najmä reprodukčných sledovaných parametrov. Ak sa použijú štatistické analýzy, vybraná metóda by mala byť vhodná na distribúciu skúmanej premennej a mala by sa zvoliť pred začiatkom štúdie. Štatistická analýza AGD a retenčnej mliečnej cysty vychádza z údajov o jednotlivých mláďatách, pričom sa zohľadňujú vplyvy spojené s vrhom. Ak je to vhodné, jednotkou analýzy je vrh. Štatistická analýza telesnej hmotnosti mláďaťa vychádza z údajov o jednotlivých mláďatách s prihliadnutím na veľkosť vrhu. Vzhľadom na veľkosť malých skupín môže byť ako pomoc pri výklade štúdie užitočné aj použitie historických údajov z kontrolných skupín (napr. pokiaľ ide o veľkosť vrhu), ak sú k dispozícii.

Vyhodnotenie výsledkov

52. Zistenia z tejto štúdie toxicity by sa mali vyhodnotiť na základe zistených účinkov, pitvy a mikroskopických nálezov. Hodnotenie bude zahŕňať vzťah medzi dávkou testovanej chemikálie a prítomnosťou alebo absenciou abnormalít, početnosťou ich výskytu, ako aj ich závažnosťou, a to vrátane makroskopických lézií, identifikovaných cieľových orgánov, neplodnosti, klinických abnormalít, ovplyvnenej reprodukčnej činnosti a schopnosti vrhnúť, zmien telesnej hmotnosti, účinkov na mortalitu a akýchkoľvek iných toxických účinkov.

53. Z dôvodu krátkeho obdobia ošetrovania samca je pri posudzovaní účinkov na reprodukčnú schopnosť samcov potrebné zvážiť histopatológiu semenníkov a nadsemenníkov spolu s údajmi o plodnosti. Ako pomôcka pri interpretácii štúdie môže byť užitočné aj použitie historických údajov o reprodukcii/vývoji z kontrolných skupín (napr. pokiaľ ide o veľkosť vrhu, AGD, retenčnú mliečnu cystu, hladiny T4 v sére), ak sú k dispozícii.

54. Na účely kontroly kvality sa navrhuje, aby sa zozbierali historické údaje z kontrolných skupín a aby sa vypočítali variačné koeficienty pre číselné údaje, najmä pre parametre spojené s detekciou endokrinného disruptora. Tieto údaje sa môžu použiť pre porovnanie, keď sa vyhodnocujú jednotlivé štúdie.

Správa o teste

55. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— zdroj, číslo šarže, konečný dátum použitia, ak sú tieto informácie k dispozícii,

— stabilita testovanej chemikálie, ak je známa.

▼**M8**

Jednozložkové látky:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Nosič (v prípade potreby):

— odôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda.

Pokusné zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky umiestnenia, potrava atď.,

— hmotnosť jednotlivých zvierat na začiatku testu,

— odôvodnenie výberu druhu, ak je iný ako potkan.

Podmienky testovania:

— odôvodnenie výberu úrovne dávky,

— údaje o príprave testovanej chemikálie/krmiva, dosiahnutých koncentráciách, stabilite a homogenite prípravku,

— podrobné údaje o podávaní testovanej chemikálie,

— prepočet koncentrácie testovanej chemikálie v krmive/pitnej vode (ppm) na skutočnú dávku (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), ak sa uplatňuje,

— podrobné informácie o kvalite potravy a vody,

— podrobný opis postupu randomizácie na výber mláďat na utratenie, ak boli utratené.

Výsledky:

— telesná hmotnosť a zmeny telesnej hmotnosti,

— spotreba potravy a spotreba vody, ak sú údaje k dispozícii,

— údaje o toxickej reakcii pri jednotlivých pohlaviach a dávkach vrátane plodnosti, gravidity a akýchkoľvek iných toxických príznakov,

— dĺžka gravidity,

— toxické alebo iné účinky na reprodukciu, potomstvo, postnatálny rast atď.,

— povaha, závažnosť a trvanie klinických pozorovaní (údaje o tom, či sú účinky vratné alebo nevratné),

— počet dospelých samíc s normálnym alebo abnormálnym estrálnym cyklom a trvanie cyklu,

— počet živonarodených zvierat a straty po implantácii,

— údaje o telesnej hmotnosti mláďat,

— AGD všetkých mláďat (a telesná hmotnosť v deň merania AGD),

▼M8

— retenčná mliečna cysta pri samčích mláďatách,

— hladiny hormónov štítnej žľazy pri mláďatách na 13. deň a dospelých samcoch (a pri matkách a mláďatách na 4. deň, ak sa uskutočnilo meranie),

— počet mláďat s makroskopicky viditeľnými abnormalitami, všeobecné hodnotenie vonkajších pohlavných orgánov, počet nevyvinutých jedincov,

— čas uhynutia počas štúdie alebo údaj, či zvieratá prežili do usmrtenia,

— počet implantátov, veľkosť vrhu a hmotnosť vrhu v čase zaznamenávania,

— telesná hmotnosť pri usmrtení a údaje o hmotnosti orgánov rodičov,

— pitevné nálezy,

— podrobný opis histopatologických pozorovaní,

— údaje o absorpcii (ak sú k dispozícii),

— štatistické spracovanie výsledkov v prípade potreby.

Rozbor výsledkov.

Závery.

Interpretácia výsledkov

56. Štúdia umožní hodnotenia reprodukčnej/vývojovej toxicity v súvislosti s podávaním opakovaných dávok (pozri odseky 5 a 6). Mohla by poskytnúť údaj o potrebe vykonať ďalšie skúmania a poskytuje usmernenia pri navrhovaní následných štúdií. Pri interpretácii výsledkov skúmania reprodukcie a vývoja by sa malo nahliadnuť do usmerňovacieho dokumentu OECD 43 (12). V usmerňovacom dokumente OECD č. 106 o histopatologickom hodnotení endokrinných a reprodukčných testov pri hlodavcoch (11) sa nachádzajú informácie o príprave a hodnotení (endokrinných) orgánov a vaginálnych sterov, ktoré môžu byť užitočné pre toto usmernenie na vykonávanie testov (TG).

LITERATÚRA

(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**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV [POZRI AJ USMERŇOVACÍ DOKUMENT OECD Č. 150 (6)]

Androgénny účinok je schopnosť chemikálie pôsobiť v organizme cicavcov ako prirodzený androgénny hormón (napr. testosterón).

Antiandrogénny účinok je schopnosť chemikálie potlačiť v organizme cicavcov pôsobenie prirodzeného androgénneho hormónu (napr. testosterónu).

Antiestrogénový účinok je schopnosť chemikálie potlačiť v organizme cicavcov pôsobenie prirodzeného estrogénového hormónu (napr. estradiolu 17ß).

Antityreoidné pôsobenie je schopnosť chemikálie potlačiť v organizme cicavcov pôsobenie prirodzeného hormónu štítnej žľazy (napr. T_3).

Chemikália je látka alebo zmes.

Vývojová toxicita je prejav reprodukčnej toxicity predstavujúci prenatálne, perinatálne, postnatálne, štrukturálne alebo funkčné poruchy potomstva.

Dávkovanie je všeobecný pojem, ktorý zahŕňa dávku, frekvenciu a trvanie podávania dávok.

Dávka je množstvo podanej testovanej chemikálie. Dávka je vyjadrená ako hmotnosť testovanej chemikálie na jednotku telesnej hmotnosti pokusného zvieraťa za deň (napr. mg/kg telesnej hmotnosti/deň) alebo ako konštantná koncentrácia v potrave.

Zjavná toxicita je všeobecný termín opisujúci jasné toxické príznaky po podaní testovanej chemikálie. Tieto príznaky by mali postačovať na posúdenie nebezpečnosti a pri zvýšení podanej dávky by podľa nich malo byť možné predpokladať výskyt závažných toxických príznakov a pravdepodobnej mortality.

Porucha plodnosti predstavuje poruchy samčích alebo samičích reprodukčných funkcií alebo reprodukčnej schopnosti.

Toxicita v prípade matiek znamená nežiaduce účinky na gravidné samice, ktoré sa vyskytujú buď špecificky (priamy účinok), alebo nešpecificky (nepriamy účinok).

NOAEL je skratka pre hladinu bez pozorovaného nepriaznivého účinku. Je to najvyššia úroveň dávky, pri ktorej po podaní testovanej chemikálie nie sú pozorované žiadne nepriaznivé nálezy.

Estrogénový účinok je schopnosť chemikálie pôsobiť v organizme cicavcov ako prirodzený estrogénový hormón (napr. estradiol 17ß).

Reprodukčná toxicita predstavuje škodlivé účinky na potomstvo a/alebo poruchu samčích alebo samičích reprodukčných funkcií alebo reprodukčnej schopnosti.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

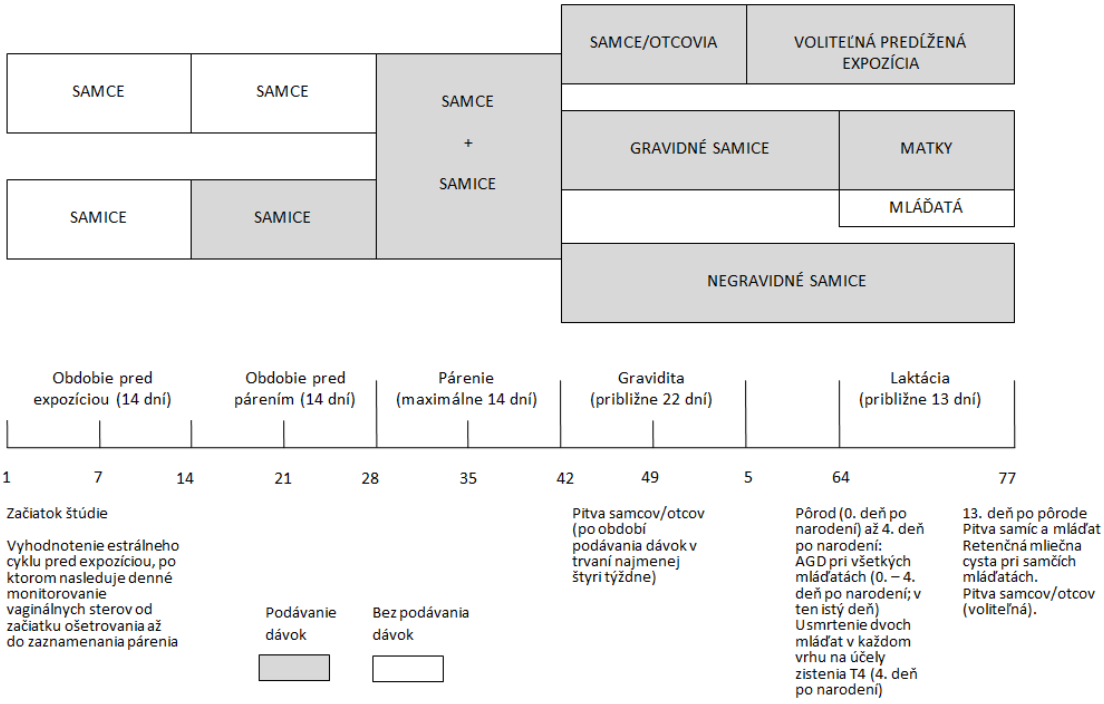
Tyreoidné pôsobenie je schopnosť chemikálie pôsobiť v organizme cicavcov ako prirodzený hormón štítnej žľazy (napr. T_3).

Validácia je vedecký postup určený na charakterizovanie prevádzkových požiadaviek a obmedzení testovacej metódy a na preukázanie jej spoľahlivosti a relevantnosti pre konkrétny účel.

▼**M8**

Dodatok 2

SCHÉMA HARMONOGRAMU TESTU ZNÁZORŇUJÚCA MAXIMÁLNE TRVANIE ŠTÚDIE NA ZÁKLADE ÚPLNÉHO 14-DŇOVÉHO OBDOBIA PÁRENIA



▼**M8**

Dodatok 3

SÚHRNNÁ SPRÁVA V TABUĽKOVEJ PODOBE O ÚČINKOCH NA REPRODUKCIU/VÝVOJ

POZOROVANIA	HODNOTY				
Dávkovanie (jednotky)	0 (kontrola)	…	…	…	…
Počet párov na začiatku (N)					
Estrálny cyklus (minimálne stredná dĺžka a frekvencia nepravidelných cyklov)					
Samice vykazujúce známky kopulácie (N)					
Samice, pri ktorých nastala gravidita (N)					
Dni počatia 1 – 5 (N)					
Dni počatia 6 –... ([1]) (N)					
Gravidita ≤ 21 dní (N)					
Gravidita = 22 dní (N)					
Gravidita ≥ 23 dní (N)					
Matky so živonarodenými mláďatami (N)					
Matky so živými mláďatami na 4. deň pp (N)					
Počet implantátov na matku (stredná hodnota)					
Počet živých mláďat na matku pri narodení (stredná hodnota)					
Počet živých mláďat na matku na 4. deň (stredná hodnota)					
Pomer pohlaví (samec/samica) pri narodení (stredná hodnota)					
Pomer pohlaví (samec/samica) na 4. deň (stredná hodnota)					
Hmotnosť vrhu pri narodení (stredná hodnota)					
Hmotnosť vrhu na 4. deň (stredná hodnota)					
Hmotnosť mláďat pri narodení (stredná hodnota)					
Hmotnosť mláďat v čase merania AGD (stredná hodnota pri samcoch, stredná hodnota pri samiciach)					

▼**M8**

POZOROVANIA	HODNOTY				
Dávkovanie (jednotky)	0 (kontrola)	…	…	…	…
AGD mláďat meraná v rovnaký postnatálny deň, medzi 0. až 4. PND (stredná hodnota pri samcoch, stredná hodnota pri samiciach, zaznamenať PND)					
Hmotnosť mláďat na 4. deň (stredná hodnota)					
Retenčná mliečna cysta pri samčích mláďatách na 13. deň (stredná hodnota)					
Hmotnosť mláďat na 13. deň (stredná hodnota)					
ABNORMÁLNE MLÁĎATÁ					
Matky s počtom 0					
Matky s počtom 1					
Matky s počtom ≥ 2					
STRATA POTOMSTVA					
Prenatálna/postimplantačná (počet implantátov mínus živonarodené mláďatá)					
Samice s počtom 0					
Samice s počtom 1					
Samice s počtom 2					
Samice s počtom ≥ 3					
Postnatálna (životnarodené mláďatá mínus živé mláďatá na 13. postnatálny deň)					
Samice s počtom 0					
Samice s počtom 1					
Samice s počtom 2					
Samice s počtom ≥ 3					

([1]) posledný deň obdobia párenia

▼M8

B.64. KOMBINOVANÁ ŠTÚDIA TOXICITY PO OPAKOVANÝCH DÁVKACH SO SKRÍNINGOVÝM TESTOM REPRODUKČNEJ/VÝVOJOVEJ TOXICITY

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 422 (2016). Usmernenia OECD na testovanie chemikálií sa pravidelne revidujú vzhľadom na vedecký pokrok. Pôvodné usmernenie 422 na vykonávanie skríningových testov bolo prijaté v roku 1996 na základe protokolu pre „Kombinovaný skríningový test toxicity po opakovaných dávkach a reprodukčnej/vývojovej toxicity“, o ktorom sa diskutovalo na dvoch stretnutiach odborníkov, a to v Londýne v roku 1990 (1) a v Tokiu v roku 1992 (2).

2. Táto testovacia metóda spája časť skríningu reprodukčnej/vývojovej toxicity, ktorá je založená na skúsenostiach získaných v členských krajinách pri používaní pôvodnej metódy v prípade existujúcich chemikálií s vysokým objemom výroby a v prieskumných testoch s látkami, ktoré slúžia ako pozitívna kontrola (3) (4), a časť zameranú na toxicitu po opakovaných dávkach v súlade s usmernením OECD na vykonávanie testov 407 (28-dňová štúdia orálnej toxicity po opakovaných dávkach pri hlodavcoch; zodpovedá kapitole B.7 tejto prílohy).

3. Táto testovacia metóda bola doplnená o príslušné sledované parametre endokrinných disruptorov, a to v nadväznosti na činnosť s vysokou prioritou, ktorú začala OECD v roku 1998 s cieľom zrevidovať existujúce usmernenia na vykonávanie testov a vypracovať nové usmernenia na vykonávanie testov na skríning a testovanie potenciálnych endokrinných disruptorov (5). V tomto kontexte bolo TG 407 (ktoré zodpovedá kapitole B.7 tejto prílohy) v roku 2008 rozšírené o parametre vhodné na určenie endokrinného pôsobenia testovaných chemikálií. Cieľom aktualizácie TG 422 bolo zahrnúť niektoré príslušné sledované parametre endokrinných disruptorov do TG týkajúcich sa skríningu, kde časy expozície zahŕňajú niektoré z citlivých období počas vývoja (prenatálne alebo skoré postnatálne obdobie).

4. Tieto vybrané dodatočné príslušné sledované parametre endokrinných disruptorov, ktoré sú zároveň súčasťou TG 443 (Rozšírená jednogeneračná štúdia reprodukčnej toxicity; zodpovedá kapitole B.56 tejto prílohy) boli zahrnuté do TG 422 na základe štúdie uskutočniteľnosti, ktorá sa týkala vedeckých a technických otázok súvisiacich s ich zaradením, ako aj možných úprav koncepcie testu potrebných na ich zaradenie (6).

5. Táto testovacia metóda je navrhnutá tak, aby sa v nej generovali obmedzené informácie týkajúce sa účinkov testovanej chemikálie na samčiu a samičiu reprodukčnú schopnosť, ako sú funkcie pohlavných žliaz, rozmnožovacie správanie, počatie, vývoj zárodku a pôrod. Nie je alternatívou k existujúcim testovacím metódam B.31, B.34, B.35 alebo B.56, ani ich nenahrádza.

POČIATOČNÉ ÚVAHY

6. Pri posudzovaní a vyhodnocovaní toxických charakteristík testovanej chemikálie možno orálnu toxicitu pomocou opakovaných dávok stanoviť po získaní prvotných informácií o toxicite prostredníctvom testovania akútnej toxicity. Táto štúdia poskytuje informácie o možnej nebezpečnosti pre zdravie, ktorá môže pravdepodobne vyplynúť z opakovanej expozície počas pomerne obmedzeného časového obdobia. Metóda zahŕňa základnú štúdiu toxicity po opakovaných dávkach, ktorú možno použiť v prípade chemikálií, pri ktorých nie je odôvodnené vykonať 90-dňovú štúdiu (napr. keď objem produkcie neprekračuje určité limity), alebo ju možno použiť ako predbežnú štúdiu k dlhodobej štúdii. Pri vykonávaní štúdie je potrebné sa riadiť zásadami a hľadiskami uvedenými v usmerňovacom dokumente OECD č. 19 o uznávaní, posudzovaní a používaní klinických príznakov ako sledovaných parametrov u ľudí v prípade pokusných zvierat používaných na hodnotenie bezpečnosti (7).

▼**M8**

7. Ďalej zahŕňa skríningový test reprodukčnej/vývojovej toxicity, a preto sa môže použiť aj na poskytnutie počiatočných informácií o možných účinkoch na samčiu a samičiu reprodukčnú schopnosť, napríklad na funkciu pohlavných žliaz, rozmnožovacie správanie, počatie, vývoj zárodku a pôrod, a to buď v skorom štádiu posudzovania toxikologických vlastností testovaných chemikálií, alebo informácií o predmetných chemikáliách. Táto testovacia metóda neposkytuje úplné informácie o všetkých aspektoch reprodukcie a vývoja. Predovšetkým ponúka len obmedzené prostriedky na zistenie postnatálnych prejavov prenatálnej expozície alebo na zistenie účinkov, ktoré môžu byť vyvolané počas postnatálnej expozície. V dôsledku (okrem iných dôvodov) selektívnosti sledovaných parametrov a krátkeho trvania štúdie táto metóda neposkytne dôkazy na podloženie konečných záverov o neexistencii reprodukčných/vývojových účinkov. Okrem toho, ak neexistujú údaje z iných testov reprodukčnej/vývojovej toxicity, pozitívne výsledky sú užitočné pri počiatočnom posúdení nebezpečnosti a prispievajú k rozhodnutiam, pokiaľ ide o potrebu a načasovanie ďalšieho testovania.

8. Výsledky získané pomocou parametrov súvisiacich s endokrinným systémom by sa mali posudzovať v kontexte „koncepčného rámca OECD na testovanie a hodnotenie chemikálií poškodzujúcich endokrinný systém“ (8). V tomto koncepčnom rámci je rozšírené usmernenie OECD TG 422 obsiahnuté na úrovni 4 ako skúška *in vivo* poskytujúca údaje o nežiaducich účinkoch na príslušné sledované parametre endokrinného systému. Signál endokrinného systému sa však sám osebe nemusí považovať za dostatočný dôkaz, že testovaná chemikália je endokrinným disruptorom.

9. Pri tejto testovacej metóde sa kladie dôraz aj na neurologické účinky ako na osobitný sledovaný parameter, pričom sa zdôrazňuje potreba venovať pozornosť dôsledným klinickým pozorovaniam zvierat, aby sa získalo čo najviac informácií. Pri tejto metóde by sa mal určiť neurotoxický potenciál chemikálií, na základe ktorého možno následne odôvodniť ďalšie podrobné preskúmanie tohto aspektu. Navyše môže táto metóda poskytnúť základné údaje o imunologických účinkoch.

10. Ak neexistujú údaje z iných štúdií systémovej toxicity, reprodukčnej/vývojovej toxicity, neurotoxicity a/alebo imunotoxicity, pozitívne výsledky sú užitočné pri počiatočnom posúdení nebezpečnosti a prispievajú k rozhodnutiam, pokiaľ ide o potrebu a načasovanie ďalšieho testovania. Test môže byť obzvlášť užitočný ako súčasť súboru dostupných údajov charakterizujúcich danú látku (SIDS) OECD na posúdenie existujúcich chemikálií, o ktorých je k dispozícii len málo toxikologických informácií alebo žiadne toxikologické informácie, a môže slúžiť ako alternatíva k vykonaniu dvoch samostatných testov na toxicitu po opakovaných dávkach (OECD TG 407, zodpovedajúce kapitole B.7 tejto prílohy) a na reprodukčnú/vývojovú toxicitu (OECD TG 421, zodpovedajúce kapitole B.63 tejto prílohy). Môže sa použiť aj ako štúdia na zistenie rozsahu dávok pre rozsiahlejšie štúdie o reprodukčnej/vývojovej toxicite, alebo ak sa to inak považuje za relevantné.

11. Vo všeobecnosti sa predpokladá, že existujú rozdiely v citlivosti medzi gravidnými a negravidnými zvieratami. V dôsledku toho môže byť v tomto kombinovanom teste zložitejšie určiť úrovne dávok, ktoré sú primerané na hodnotenie všeobecnej systémovej toxicity aj špecifickej reprodukčnej/vývojovej toxicity, v porovnaní so situáciou, keď sa jednotlivé testy vykonávajú samostatne. Okrem toho výklad výsledkov testu, pokiaľ ide o všeobecnú systémovú toxicitu, môže byť náročnejší než vtedy, keď sa vykonáva samostatná štúdia toxicity po opakovaných dávkach, najmä keď sa sérové a histopatologické parametre nehodnotia v štúdii súčasne. Vzhľadom na uvedenú technickú zložitosť sú na vykonanie tohto

▼**M8**

kombinovaného skríningového testu potrebné značné skúsenosti v oblasti testovania toxicity. Na druhej strane môže tento kombinovaný test okrem menšieho počtu použitých zvierat ponúknuť lepšie prostriedky na rozlíšenie priamych účinkov na reprodukciu/vývoj od účinkov, ktoré sú sekundárne k iným (systémovým) účinkom.

12. V tomto teste je obdobie podávania dávok dlhšie než v bežnej 28-dňovej štúdii toxicity po opakovaných dávkach. V porovnaní so situáciou, keď sa popri skríningovom teste reprodukčnej/vývojovej toxicity uskutočňuje bežná 28-dňová štúdia toxicity po opakovaných dávkach, sa však použije menej zvierat z každého pohlavia na skupinu.

13. Pri tejto testovacej metóde sa testovaná chemikália podáva orálne. Ak sa použijú iné spôsoby expozície, môžu sa vyžadovať úpravy.

14. Pred použitím tejto testovacej metódy na zmesi s cieľom generovať údaje plánované na regulačné účely by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na tento účel, a ak áno, tak prečo. Takéto úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi.

15. Vymedzenie použitých pojmov sa uvádza v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

16. Testovaná chemikália sa podáva viacerým skupinám samčích a samičích pokusných zvierat v odstupňovaných dávkach. Samcom by sa mali dávky podávať najmenej štyri týždne až do dňa naplánovaného usmrtenia vrátane tohto dňa (to znamená minimálne dva týždne pred párením, počas obdobia párenia a približne dva týždne po párení). Vzhľadom na obmedzené obdobie podávania dávok pred párením pri samcoch nemôže plodnosť predstavovať osobitný citlivý ukazovateľ testikulárnej toxicity. Z toho dôvodu je dôležité podrobné histologické vyšetrenie semenníkov. Na zistenie väčšiny účinkov na samčiu plodnosť a spermatogenézu sa za dostatočnú kombináciu považuje spojenie dvojtýždňového obdobia podávania dávok pred párením a následných pozorovaní párenia/plodnosti s najmenej štvortýždňovým celkovým obdobím podávania dávok, po ktorom nasleduje podrobná histopatológia samčích pohlavných žliaz.

17. Samiciam by sa mali podávať dávky počas celej štúdie. To zahŕňa dva týždne pred párením (s cieľom pokryť aspoň dva úplné estrálne cykly), variabilný čas do počatia, trvanie gravidity a najmenej trinásť dní po pôrode až do dňa pred naplánovaným usmrtením vrátane tohto dňa.

18. Trvanie štúdie – po aklimatizácii a vyhodnotení estrálneho cyklu pred začatím podávania dávok – závisí od stavu samice a má dĺžku približne 63 dní [najmenej 14 dní pred obdobím párenia, (do) 14 dní obdobia párenia, 22 dní gravidity, 13 dní laktácie].

19. Počas obdobia podávania sa zvieratá dôkladne pozorujú, pričom sa denne kontroluje prítomnosť toxických príznakov. Pitva sa uskutoční na zvieratách uhynutých alebo usmrtených počas testovania, ako aj po ukončení testu na zvieratách, ktoré test prežijú.

▼M8

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

20. Táto testovacia metóda je určená na použitie s potkanmi. Ak sa parametre uvedené v rámci tohto TG 422 skúmajú pri inom druhu hlodavcov, je potrebné uviesť podrobné odôvodnenie. V rámci medzinárodného programu overovania na zistenie endokrinných disruptorov v TG 407 sa použili iba potkany. Kmene s nízkou plodnosťou alebo kmene, o ktorých je známe, že majú vysoký výskyt vývojových porúch, by sa nemali používať. Mali by byť použité zdravé panenské zvieratá, ktoré dosiaľ neboli predmetom žiadnych testov. Pokusné zvieratá by mali byť charakterizované, pokiaľ ide o druh, kmeň, pohlavie, hmotnosť a vek. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variabilita použitých zvierat minimálna a nemala by presiahnuť ±20 % strednej hmotnosti každého pohlavia. Ak sa táto štúdia uskutočňuje ako predbežná štúdia k dlhodobej alebo celogeneračnej štúdii, je lepšie v oboch štúdiách použiť zvieratá toho istého druhu a z toho istého zdroja.

Umiestnenie a kŕmenie

21. Všetky postupy musia byť v súlade s miestnymi normami starostlivosti o laboratórne zvieratá. Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá má byť 22 °C (± 3 °C). Relatívna vlhkosť by mala dosahovať minimálne 30 % a pokiaľ možno, okrem obdobia počas čistenia miestnosti, by nemala presiahnuť 70 %. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej chemikálie, keď sa podáva týmto spôsobom.

22. Zvieratá by mali byť umiestnené spolu v malých skupinách rovnakého pohlavia. Ak je to vedecky opodstatnené, zvieratá môžu byť umiestnené samostatne. Pokiaľ ide o umiestnenie skupín do klietok, v jednej klietke by nemalo byť viac ako päť zvierat. Párenie sa uskutoční v klietkach, ktoré sú vhodné na tento účel. Gravidné samice by mali byť jednotlivo umiestnené do klietok a mal by sa im poskytnúť materiál na tvorbu hniezda. Samice v laktácii sa jednotlivo umiestnia do klietok so svojím potomstvom.

23. Krmivo treba pravidelne analyzovať, aby sa zistilo, či neobsahuje kontaminanty. Vzorka krmiva by sa mala zachovať až do dokončenia správy.

Príprava zvierat

24. Zdravé, mladé, dospelé zvieratá sa náhodne rozdelia a priradia sa do pokusných skupín a jednotlivých klietok. Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy spôsobené ich umiestnením. Zvieratá sa jednotlivo označia. Zvieratá sa v klietkach aklimatizujú na laboratórne podmienky najmenej päť dní pred začatím štúdie.

Príprava dávok

25. Odporúča sa, aby sa testovaná chemikália podávala orálne, pokiaľ sa iná cesta podania nepokladá za vhodnejšiu. Keď sa zvolí orálna cesta, testovaná chemikália sa obvykle podáva sondou. Alternatívne sa však testované chemikálie môžu podávať aj v krmive alebo pitnej vode.

26. V prípade potreby sa testovaná chemikália rozpustí alebo suspenduje vo vhodnom nosiči. Odporúča sa, aby sa vždy, keď je to možné, najskôr zvážilo použitie vodného roztoku/suspenzie, potom roztoku/suspenzie v oleji (napr. kukuričnom oleji) a nakoniec použitie prípadného roztoku v iných nosičoch. Pre iné nosiče ako voda majú byť známe toxické vlastnosti nosiča. Mala by sa určiť stabilita a homogenita testovanej chemikálie v nosiči.

▼M8

POSTUP

Počet zvierat a ich pohlavie

27. Odporúča sa, aby každá skupina začala najmenej s 10 samcami a 12 – 13 samicami. Pri samiciach sa pred expozíciou vyhodnotí estrálny cyklus a zvieratá, ktoré nevykazujú príznačné 4 – 5-dňové cykly, nebudú zaradené do štúdie. Preto sa odporúča viac samíc, aby na skupinu pripadalo 10 samíc. Očakáva sa, s výnimkou prípadov výrazných toxických účinkov, že takto sa dosiahne počet najmenej 8 gravidných samíc na skupinu, čo je obvykle minimálny prijateľný počet gravidných samíc na skupinu. Cieľom je dosiahnuť dostatočný počet gravidných samíc a potomkov, aby sa zabezpečilo zmysluplné hodnotenie potenciálu testovanej chemikálie pôsobiť na plodnosť, graviditu, materské a dojčenské správanie, ako aj na rast a vývoj potomstva generácie F_1 od počatia do 13. dňa po pôrode. Ak sa plánuje usmrtenie zvierat v priebehu štúdie, ich počet by mal byť zvýšený o plánovaný počet zvierat, ktoré majú byť usmrtené pred kompletizáciou štúdie. Treba zvážiť použitie ďalšej satelitnej skupiny piatich zvierat z každého pohlavia ku kontrolnej skupine a k skupine vystavenej najvyššej dávke na účely pozorovania vratnosti, perzistencie alebo oneskorenia systémových toxických účinkov, a to najmenej počas 14 dní po ošetrení. Zvieratá zo satelitnej skupiny sa nebudú páriť, a teda nebudú použité na posúdenie reprodukčnej/vývojovej toxicity.

Dávkovanie

28. Bežne sa používajú tri testované skupiny a jedna kontrolná skupina. Ak nie sú k dispozícii vhodné všeobecné údaje o toxicite, môže sa vykonať štúdia na zistenie rozsahu dávok (zvieratá toho istého kmeňa a z toho istého zdroja), aby sa ľahšie stanovili dávky, ktoré sa použijú. So zvieratami v kontrolnej skupine sa musí zaobchádzať takisto ako so zvieratami v testovaných skupinách, s výnimkou aplikovania testovanej chemikálie. Ak sa pri podávaní testovanej chemikálie používa nosič, kontrolná skupina dostane nosič v najvyššom používanom objeme.

29. Pri výbere úrovní dávok by sa mali brať do úvahy existujúce údaje o toxicite a (toxiko-) kinetike. Okrem toho by sa malo vziať do úvahy, že môžu existovať rozdiely v citlivosti medzi gravidnými a negravidnými samicami. Najvyššia úroveň dávky sa vyberie tak, aby vyvolala toxické účinky, ale nespôsobila uhynutie zvierat ani zjavné utrpenie. Potom sa klesajúca postupnosť úrovní dávok zvolí tak, aby sa preukázala každá odozva na dávku a stanovila sa najnižšia úroveň dávky, pri ktorej nevznikajú žiadne nežiaduce účinky. Často sú na to optimálne intervaly predstavujúce dvoj- až štvornásobok, pričom pridanie štvrtej testovanej skupiny je často vhodnejšie než použitie veľmi veľkých intervalov medzi dávkami (napr. viac než 10-násobku).

30. Ak sa pozoruje všeobecná toxicita (napr. zníženie telesnej hmotnosti, účinky na pečeň, srdce, pľúca alebo obličky atď.) alebo iné zmeny, ktoré nemusia byť toxikologickou reakciou (napr. nižší príjem potravy, zväčšenie pečene), pri interpretácii pozorovaných účinkov na endokrinné citlivé sledované parametre je potrebné postupovať obozretne.

Limitný test

31. Ak sa v orálnej štúdii s jednou úrovňou dávky dosahujúcou minimálne 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň alebo, v prípade podávania v krmive, pri rovnakom percentuálnom podiele v krmive alebo pitnej vode (na základe hodnôt podľa telesnej hmotnosti) s použitím postupov opísaných pre túto štúdiu neprejavia žiadne pozorovateľné toxické účinky a ak sa vzhľadom na údaje o štrukturálne príbuzných látkach toxicita neočakáva, potom sa môže upustiť od úplnej štúdie zahŕňajúcej viaceré úrovne dávok. Limitný test sa

▼M8

neuplatňuje vtedy, keď z expozície ľudí vyplýva, že je potrebné použiť vyššiu dávku. V prípade iných ciest podania, napr. pri inhalácii alebo dermálnej aplikácii, môžu maximálnu dosiahnuteľnú expozíciu často určovať fyzikálno-chemické vlastnosti testovaných chemikálií.

Podávanie dávok

32. Zvieratám sa podáva testovaná chemikália každý deň, 7 dní v týždni. Ak je testovaná chemikália podávaná cez sondu, musí sa to realizovať v jednej dávke pre zviera s použitím žalúdočnej sondy alebo vhodnej intubačnej kanyly. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Objem nemá byť vyšší ako 1 ml/100 g telesnej hmotnosti, s výnimkou vodných roztokov, pri ktorých sa môže použiť objem 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. S výnimkou dráždivých alebo žieravých testovaných chemikálií, ktoré pri vyšších koncentráciách zvyčajne spôsobujú zhoršenie účinkov, by sa variabilita v aplikovanom objeme mala minimalizovať tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem pri všetkých úrovniach dávok.

33. V prípade podávania testovaných chemikálií v krmive alebo pitnej vode je dôležité zaistiť, aby množstvo obsiahnutej testovanej chemikálie nenarúšalo normálnu nutričnú alebo vodnú rovnováhu. Keď sa testovaná chemikália podáva v krmive, môže sa použiť buď stála koncentrácia v krmive (ppm), alebo stála úroveň dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvierat; iné možnosti by sa mali špecifikovať. V prípade podávania testovanej chemikálie pomocou sondy sa príslušná dávka podáva každý deň približne v rovnakom čase a aspoň raz za týždeň sa upraví, aby sa zachovala stála úroveň dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvierat. Ak sa kombinovaná štúdia použije ako predbežná štúdia k dlhodobej štúdii alebo úplnej štúdii o reprodukčnej toxicite, v obidvoch štúdiách sa použije rovnaké krmivo.

Harmonogram testu

34. Podávanie dávky obom pohlaviam by sa malo začať dva týždne pred párením, pričom najskôr sa zvieratá najmenej päť dní aklimatizujú a vykoná sa skríning samíc na účely zistenia normálnych estrálnych cyklov (v 2-týždňovom období pred aplikáciou chemikálie). Štúdia by sa mala naplánovať tak, aby sa hodnotenie estrálneho cyklu začalo tesne po dosiahnutí úplnej pohlavnej zrelosti zvierat. To sa v prípade rôznych kmeňov potkanov v rôznych laboratóriách môže mierne líšiť, napr. pri potkanoch z kmeňa Sprague Dawley je to vo veku 10 týždňov a pri potkanoch z kmeňa Wistar približne vo veku 12 týždňov. Matky s potomstvom by mali byť usmrtené 13. deň po pôrode alebo krátko po tomto dni. V prípade, že je potrebné, aby sa matkám noc pred odberom krvi nepodávala potrava (ak sa uprednostňuje táto možnosť), nemusia byť matky a ich potomstvo nevyhnutne usmrtené v ten istý deň. Deň narodenia (t. j. deň ukončenia pôrodu) sa označuje ako 0. deň po pôrode. Samice, pri ktorých sa nezaznamená kopulácia, sú usmrtené 24 – 26 dní od posledného dňa obdobia párenia. Podávanie dávky pokračuje pri oboch pohlaviach počas obdobia párenia. Samcom sa dávka ďalej podáva po období párenia aspoň do skončenia minimálneho 28-dňového celkového obdobia podávania dávok. Potom sa usmrtia, prípadne sa uchovajú a naďalej sa im podáva dávka na účely možného druhého párenia, ak sa to považuje za vhodné.

35. Denné podávanie dávok rodičovským samiciam by malo pokračovať v priebehu gravidity a najmenej do 13. dňa (vrátane) po pôrode alebo do dňa pred usmrtením. V prípade štúdií, pri ktorých sa testovaná chemikália podáva inhaláciou alebo transdermálne, by podávanie dávky malo pokračovať najmenej do 19. dňa gravidity (vrátane) a podávanie dávky by sa malo čo najskôr obnoviť – najneskôr na 4. postnatálny deň (PND).

▼M8

36. Zvieratá satelitnej skupiny, ktoré sú určené na dodatočné pozorovanie, ak sú zahrnuté, sa nepária. Mali by sa uchovať najmenej ďalších 14 dní po prvom naplánovanom usmrtení matiek, bez expozície, aby bolo možné zistiť oneskorený výskyt, pretrvávanie toxických príznakov alebo zotavenie sa z nich.

37. Schéma harmonogramu testu je uvedená v dodatku 2.

Estrálne cykly

38. Estrálne cykly sa monitorujú pred začatím ošetrenia s cieľom vybrať do štúdie samice s pravidelnými cyklami (pozri odsek 27). Od začiatku obdobia ošetrenia až do zaznamenania párenia sa denne monitorujú aj vaginálne stery. Ak existujú obavy z akútnych stresových účinkov, ktoré by mohli zmeniť estrálne cykly po začatí podávania dávok, laboratóriá môžu použiť expozíciu pokusných zvierat počas 2 týždňov, potom denne odoberať vaginálne stery na monitorovanie estrálneho cyklu najmenej dva týždne počas obdobia pred párením a pokračovať s monitorovaním až do obdobia párenia, až kým sa nezaznamená párenie. Pri odbere vaginálnych/cervikálnych buniek je potrebné dbať na to, aby sa neporušila sliznica, čo by mohlo vyvolať pseudograviditu (8) (9).

Párenie

39. V tejto štúdii sa bežne používajú pomery párenia 1:1 (jeden samec a jedna samica). Výnimky sa môžu vyskytnúť v prípade príležitostných úmrtí samcov. Samica sa má nachádzať v prítomnosti toho istého samca, kým sa nezaznamená kopulácia alebo kým neuplynú dva týždne. Každé ráno sa samice vyšetria na prítomnosť spermy alebo vaginálnej zátky. Za 0. deň gravidity sa určí deň, keď sa potvrdí dôkaz o párení (zistí sa prítomnosť vaginálnej zátky alebo spermy). V prípade neúspešného párenia sa zváži opätovné párenie samíc so samcami z rovnakej skupiny s preukázanou plodnosťou.

Veľkosť vrhu

40. Na 4. deň po narodení možno upraviť veľkosť jednotlivých vrhov odstránením prebytočných mláďat náhodným výberom, aby sa v čo najväčšej miere dosiahli vrhy so štyrmi alebo piatimi mláďatami z každého pohlavia v závislosti od bežnej veľkosti vrhu použitého kmeňa potkanov. Z dvoch prebytočných mláďat sa odoberú vzorky krvi, ktoré sa zlúčia a použijú na určenie hladín hormónu T4 v sére. Nie je vhodné selektívne odstraňovanie mláďat, napríklad na základe telesnej hmotnosti alebo anogenitálnej vzdialenosti (AGD). Ak vzhľadom na počet samčích alebo samičích mláďat nemožno dospieť k tomu, aby každý vrh tvorilo štyri až päť mláďat z každého pohlavia, je prijateľná čiastočná úprava (napríklad šesť samcov a štyri samice). Mláďatá sa neodstraňujú, ak by veľkosť vrhu klesla pod cieľovú hodnotu na utratenie (8 alebo 10 mláďat/vrh). Ak sa cieľová hodnota na utratenie prekročí len o jedno mláďa, odstráni sa len jedno mláďa, ktoré sa použije na odber krvi na prípadné vyšetrenia T4 v sére.

41. Ak sa veľkosť vrhu neupraví, 4. deň po narodení sa usmrtia dve mláďatá v každom vrhu a odoberú sa vzorky krvi na meranie koncentrácií hormónu štítnej žľazy v sére. Ak je to možné, uvedené dve mláďatá v každom vrhu by mali byť samice, aby bolo možné vyhradiť samčie mláďatá na vyhodnotenie vzniku retenčnej mliečnej cysty. Neplatí to však v prípade, keď by po odstránení týchto mláďat neostali žiadne samice na posúdenie po usmrtení. Mláďatá sa neodstraňujú, ak by veľkosť vrhu klesla pod 8 alebo 10 mláďat/vrh (v závislosti od bežnej veľkosti vrhu použitého kmeňa potkanov). Ak sa bežná veľkosť vrhu prekročí len o jedno mláďa, odstráni sa len jedno mláďa, ktoré sa použije na odber krvi na prípadné vyšetrenia T4 v sére.

▼M8

Pozorovania

42. Najmenej raz denne by sa mali vykonať všeobecné klinické pozorovania, najlepšie každý deň v rovnakom čase a so zreteľom na časový interval najintenzívnejších predpokladaných účinkov po podaní dávky. Zaznamenáva sa zdravotný stav zvierat. Je potrebné aspoň dvakrát denne sledovať chorobnosť a úmrtnosť zvierat.

43. Raz pred prvou expozíciou (aby bolo možné porovnanie jednotlivých zvierat medzi sebou) a potom najmenej raz týždenne sa uskutočňujú pri všetkých rodičovských zvieratách podrobné klinické pozorovania. Uskutočňujú sa mimo domovských klietok v štandardnom priestore, pokiaľ možno v jednotlivé dni vždy v tom istom čase. Musia byť pozorne zaznamenané, podľa možnosti s použitím hodnotiaceho systému explicitne definovaného testovacím laboratóriom. Je potrebné zaistiť čo najmenšie zmeny podmienok testovania a pozorovania má podľa možnosti viesť pozorovateľ, ktorý nie je oboznámený s postupom testovania. Medzi príznaky, ktoré je potrebné si všímať, patria zmeny na koži, srsti, očiach, slizniciach, výskyt sekrécie, exkrécie a vegetatívnej aktivity (napr. slzenie, piloerekcia, veľkosť zreničiek, nezvyčajné dýchanie), pričom uvedené príznaky nie sú vyčerpávajúce. Zmeny chôdze, držania tela a reakcie na zaobchádzanie, ako aj prítomnosť klonických alebo tonických pohybov, stereotypné správanie (napr. nadmerné čistenie sa, opakované točenie sa), náročný alebo dlhý pôrod alebo zvláštne správanie (napr. samozmrzačovanie, chôdza dozadu) sa takisto musia zaznamenať (10).

44. Jedenkrát počas štúdie sa na piatich samcov a piatich samiciach náhodne vybratých z každej skupiny uskutoční hodnotenie senzorickej reaktivity na rôznorodé podnety (napr. sluchové, vizuálne a proprioceptívne podnety) (8) (9) (11), hodnotenie sily zovretia (12) a hodnotenie motorickej aktivity (13). Ďalšie podrobnosti o postupoch, podľa ktorých možno postupovať, sú uvedené v príslušných odkazoch. Možno však použiť aj iné alternatívne postupy k postupom, ktoré tu boli opísané. Pri samcoch sa tieto funkčné pozorovania majú uskutočniť ku koncu obdobia podávania dávok, krátko pred plánovaným usmrtením, avšak pred odberom vzoriek krvi na účely hematológie alebo klinickej chémie (pozri odseky 53 – 56 vrátane poznámky pod čiarou č. 1). Počas týchto funkčných testov majú byť samice vo fyziologicky podobnom stave a podľa možnosti sa majú testovať raz počas posledného týždňa laktácie (t. j. 6. – 13. deň laktácie), krátko pred plánovaným usmrtením. V čo najväčšej možnej miere je potrebné minimalizovať čas odlúčenia matiek a mláďat.

45. Funkčné pozorovania uskutočňované raz ku koncu štúdie možno vynechať, ak sa štúdia uskutočňuje ako predbežná štúdia k následnej (90-dňovej) štúdii subchronickej toxicity alebo dlhodobej štúdii. V tomto prípade sa funkčné pozorovania uskutočnia v nasledujúcej štúdii. Na druhej strane, dostupnosť údajov o funkčných pozorovaniach z tejto štúdie toxicity po opakovanej dávke môže zvýšiť možnosť výberu úrovní dávok v nasledujúcej štúdii subchronickej toxicity alebo dlhodobej štúdii.

46. Výnimočne sa nemusia uskutočniť funkčné pozorovania ani pri skupinách, v ktorých sa inak preukážu toxické príznaky v takom rozsahu, že by mohli významne interferovať s uskutočnením funkčných testov.

47. Trvanie gravidity sa zaznamená a počíta sa od jej 0. dňa. Každý vrh je potrebné čo najskôr po pôrode vyšetriť a stanoviť počet a pohlavie mláďat, mŕtvonarodených, živonarodených a nevyvinutých jedincov (mláďat, ktoré sú výrazne menšie než príslušné mláďatá z kontrolnej skupiny) a prítomnosť výrazných abnormalít.

▼M8

48. Živé mláďatá sa spočítajú, určí sa ich pohlavie a do 24 hodín po narodení (0. alebo 1. deň po narodení) a následne najmenej na 4. a 13. deň po narodení sa určí ich telesná hmotnosť. Okrem pozorovaní rodičovských zvierat (pozri odseky 43 a 44) sa zaznamená aj akékoľvek abnormálne správanie potomstva.

49. V ten istý deň medzi 0. až 4. postnatálnym dňom sa zmeria anogenitálna vzdialenosť (AGD) každého mláďaťa. V deň merania AGD sa zisťuje aj telesná hmotnosť mláďaťa, pričom sa AGD štandardizuje na mieru veľkosti mláďaťa, najlepšie na tretiu odmocninu telesnej hmotnosti (14). Na 12. alebo 13. postnatálny deň sa určí počet bradaviek/areol pri samčích mláďatách, ako sa odporúča v usmerňovacom dokumente OECD č. 151 (15).

Telesná hmotnosť a spotreba potravy/vody

50. Samce a samice sa odvážia v prvý deň podávania dávok, potom najmenej raz týždenne a následne pri usmrtení. Počas gravidity sa samice odvážia na 0., 7., 14. a 20. deň a do 24 hodín po pôrode (0. alebo 1. deň po pôrode) a najmenej na 4. a 13. deň po pôrode. Tieto zistenia sa zaznamenajú jednotlivo pre každé dospelé zviera.

51. V období pred párením, počas gravidity a laktácie sa spotreba potravy meria najmenej raz za týždeň. Meranie spotreby potravy počas párenia je voliteľné. Počas týchto období sa meria aj spotreba vody, ak sa testovaná chemikália podáva prostredníctvom tohto média.

Hematológia

52. Jedenkrát počas štúdie sa pri piatich samcoch a piatich samiciach náhodne vybratých z každej skupiny uskutočňujú tieto hematologické vyšetrenia: hematokrit, koncentrácie hemoglobínu, počet erytrocytov, retikulocyty, celkový a diferenciálny počet leukocytov, počet trombocytov a meranie času/potenciálu zrážanlivosti krvi. Medzi ďalšie stanovenia, ktoré sa uskutočňujú, ak testovaná chemikália alebo jej predpokladané metabolity majú oxidačné vlastnosti alebo ak existuje podozrenie, že majú oxidačné vlastnosti, patrí koncentrácia methemoglobínu a Heinzove telieska.

53. Vzorky krvi sa odoberajú z označeného miesta. Počas odberu vzoriek majú byť samice vo fyziologicky podobnom stave. S cieľom predchádzať praktickým ťažkostiam spojeným s variabilitou začiatku gravidity sa môže odber krvi pri samiciach uskutočniť na konci obdobia pred párením ako alternatíva k odberu vzoriek tesne pred postupom usmrtenia zvierat alebo počas neho. Vzorky krvi samcov sa majú podľa možnosti odoberať tesne pred postupom usmrtenia zvierat alebo počas neho. Odber krvi pri samcoch sa môže prípadne uskutočniť aj na konci obdobia pred párením, ak sa tento čas uprednostnil v prípade samíc.

54. Vzorky krvi je potrebné uchovávať za vhodných podmienok.

Klinická biochémia

55. Na vzorkách krvi získaných od vybratých piatich samcov a piatich samíc z každej skupiny sa uskutočnia stanovenia v rámci klinickej biochémie s cieľom skúmať hlavné toxické účinky na tkanivá a osobitne účinky na pečeň a obličky. Odporúča sa, aby sa zvieratám cez noc pred odobratím

▼M8

vzoriek krvi nepodávala potrava ([1]). Vyšetrenie plazmy alebo séra zahŕňa sodík, draslík, glukózu, celkový cholesterol, močovinu, kreatinín, celkový obsah bielkovín a albumínu, najmenej dva enzýmy indikujúce hepatocelulárne účinky (ako alanín-aminotransferáza, aspartát-aminotransferáza a sorbitol-dehydrogenáza) a žlčové kyseliny. Meranie ďalších enzýmov (hepatálneho alebo iného pôvodu) a bilirubínu môže za určitých okolností poskytnúť užitočné informácie.

56. Vzorky krvi sa odoberajú z určeného miesta na základe tohto harmonogramu:

— najmenej dvom mláďatám na vrh na 4. deň po narodení, ak to umožňuje počet mláďat (pozri odseky 40 – 41),

— všetkým matkám a najmenej dvom mláďatám na vrh pri usmrtení na 13. deň a

— všetkým dospelým samcom pri usmrtení.

Všetky vzorky krvi sa uchovávajú za vhodných podmienok. Vzorky krvi mláďat z 13. dňa a dospelých samcov sa posudzujú, pokiaľ ide o hladiny hormónov štítnej žľazy (T4) v sére. Ak je to relevantné, vykoná sa ďalšie posúdenie T4 vo vzorkách krvi matiek a mláďat zo 4. dňa. V relevantných prípadoch možno voliteľne vykonať meranie iných hormónov. Na účely analýzy hormónov štítnej žľazy možno krv mláďat zlúčiť v rámci vrhu. Hormóny štítnej žľazy (T4 a TSH) sa majú podľa možnosti merať ako celková hodnota.

57. Voliteľne možno počas posledného týždňa štúdie vykonať rozbor moču piatich náhodne vybratých samcov z každej skupiny, pričom sa použije časový zber objemu moču, na stanovenie týchto parametrov: vzhľad, objem, osmolalita alebo špecifická hmotnosť, pH, bielkoviny, glukóza a krv/krvné bunky.

58. Okrem toho by sa mali brať do úvahy aj štúdie na vyšetrovanie sérových markerov všeobecného poškodenia tkaniva. Medzi ďalšie stanovenia, ktoré sa uskutočňujú, ak známe vlastnosti testovanej chemikálie môžu ovplyvňovať alebo existuje podozrenie, že ovplyvňujú príbuzné metabolické profily, patrí stanovenie vápnika, fosfátu, hladiny triglyceridov nalačno a glykémie nalačno, špecifických hormónov, methemoglobínu a cholínesterázy. Tieto prípady je potrebné identifikovať jednotlivo.

59. Variabilitu a absolútne koncentrácie hormonálnych ukazovateľov môžu ovplyvniť tieto faktory:

— čas usmrtenia z dôvodu každodennej zmeny koncentrácií hormónov,

([1]) Pri mnohých meraniach v sére a plazme, najmä v prípade glukózy, sa uprednostňuje nepodávanie potravy cez noc pred odberom. Hlavným dôvodom je zvýšenie pravdepodobnosti kolísania hodnôt ako nevyhnutný dôsledok prijímania potravy. Môže to viesť k zakrytiu jemnejších účinkov a k sťaženiu interpretácie. Na druhej strane však celonočné neprijímanie potravy môže interferovať so všeobecným metabolizmom (gravidných) zvierat, narúša laktáciu a správanie pri starostlivosti o mláďatá a predovšetkým v štúdiách, v ktorých sa dávky podávajú v krmive, môže narušiť denné pôsobenie testovanej chemikálie. Ak sa použije celonočné nepodávanie potravy, klinicko-biochemické stanovenia sa v prípade samcov uskutočňujú po funkčných pozorovaniach v štvrtom týždni štúdie. Matky sa zachovajú ešte jeden deň navyše po odobratí mláďat, napríklad na 13. postnatálny deň. Matkám sa medzi 13. a 14. dňom laktácie celonočne nepodáva potrava a krv odobratá pri usmrtení sa použije na určenie parametrov klinickej chémie.

▼M8

— metóda usmrtenia s cieľom zabrániť neprimeranému stresu pre zvieratá, ktorý môže ovplyvniť koncentrácie hormónov,

— súpravy na testovanie hormonálnych ukazovateľov, ktoré sa môžu líšiť štandardnými krivkami.

60. Vzorky plazmy osobitne určené na stanovenie hladiny hormónov sa odoberú počas porovnateľných denných časov. Číselné hodnoty získané analýzou koncentrácií hormónov sa v prípade použitia rozličných komerčne dostupných testovacích súprav líšia.

61. Ak sú historické bazálne hodnoty nevhodné, zváži sa stanovenie premenných v oblasti hematológie a klinickej biochémie pred začatím dávkovania alebo podľa možnosti na skupine zvierat, ktoré neboli zaradené do pokusných skupín. V prípade samíc musia údaje pochádzať z dojčiacich zvierat.

PATOLÓGIA

Makroskopická pitva

62. Všetky dospelé zvieratá v štúdii budú predmetom úplnej detailnej makroskopickej pitvy, ktorá zahŕňa pozorné vyšetrenie vonkajšieho povrchu tela, všetkých telesných otvorov a lebečnej, hrudnej a brušnej dutiny a ich obsahu. Osobitná pozornosť sa venuje orgánom reprodukčného systému. Je potrebné zaznamenať počet implantačných miest. V deň pitvy sa vyšetria vaginálne stery, aby sa určilo štádium estrálneho cyklu a umožnilo určenie korelácie s histopatológiou v reprodukčných orgánoch samíc.

63. Semenníky a nadsemenníky, ako aj prostata a semenné mechúriky s koagulačnými žľazami ako celok všetkých dospelých zvierat sa podľa potreby zbavia priľahlých tkanív a čo najskôr po disekcii sa určí ich vlhká hmotnosť, kým orgány nevyschnú. Okrem toho možno voliteľne určiť hmotnosť orgánov, ako je komplex zdvíhača konečníka a bulbokavernóznych svalov, Cowperove žľazy a žaluď pri samcoch a párové vaječníky (vlhká hmotnosť) a maternica (vrátane krčka maternice) pri samiciach. V prípade zahrnutia týchto orgánov je potrebné určiť ich hmotnosť čo najskôr po disekcii. Zachovať sa majú vaječníky, semenníky, nadsemenníky, akcesórne pohlavné orgány, ako aj všetky orgány vykazujúce makroskopické lézie zo všetkých dospelých zvierat.

64. Zo všetkých dospelých samcov a samíc a z jedného samčieho a jedného samičieho mláďaťa z 13. dňa z každého vrhu sa má zachovať štítna žľaza v čo najvhodnejšom fixačnom médiu na neskoršie zamýšľané histopatologické vyšetrenie. Hmotnosť štítnej žľazy sa môže určiť po fixácii. Orezanie je potrebné vykonať veľmi opatrne a až po fixácii, aby sa predišlo poškodeniu tkaniva. Poškodenie tkaniva by mohlo ohroziť histopatologickú analýzu. Vzorky krvi sa odoberajú zo stanoveného miesta tesne pred postupom usmrtenia zvierat alebo počas tohto postupu a uchovávajú sa za vhodných podmienok (pozri odsek 56).

▼M8

65. Okrem toho sa najmenej pri piatich dospelých samcoch a samiciach náhodne vybratých z každej skupiny (okrem moribundných a/alebo usmrtených pred ukončením štúdie) z pečene, obličiek, nadobličiek, týmusu, zo sleziny, z mozgu a zo srdca podľa možnosti odstráni všetko priľahlé tkanivo a ich vlhká hmotnosť sa zaznamená čo najskôr po disekcii, kým orgány nevyschnú. Tieto tkanivá sa uchovávajú v čo najvhodnejšom fixačnom médiu vzhľadom na typ tkanív a neskoršie zamýšľané histopatologické vyšetrenie: všetky makroskopické lézie, mozog (reprezentatívne oblasti vrátane veľkého mozgu, mozočka a mosta), miecha, oko, žalúdok, tenké a hrubé črevo (vrátane Peyerových plakov), pečeň, obličky, nadobličky, slezina, srdce, týmus, priedušnica a pľúca (uskladnené nafúknutím s fixačným prostriedkom a potom ponorením), gonády (semenníky a vaječníky), akcesórne pohlavné orgány (maternica a krčok maternice, nadsemenníky, prostata, semenné mechúriky s koagulačnými žľazami), vagína, močový mechúr, lymfatické uzliny [okrem najbližšej odvodňovacej uzliny by sa mala odobrať ešte jedna lymfatická uzlina podľa praxe laboratória (16)], periférny nerv (sedací alebo tibiálny) podľa možnosti čo najbližšie k svalu, kostrový sval a kosť, s kostnou dreňou (prierez alebo čerstvo odobratá vzorka kostnej drene). Odporúča sa fixovať semenníky ponorením do Bouinovho fixačného prostriedku alebo modifikovaného Davidsonovho fixačného prostriedku (16) (17) (18); pre tieto tkanivá sa neodporúča fixácia formalínom. Obal *tunica albuginea* sa môže opatrne a plytko prepichnúť ihlou na oboch stranách orgánu, aby sa umožnilo rýchle napustenie fixačným prostriedkom. Z klinických a iných nálezov môže vyplynúť potreba vyšetrenia ďalších tkanív. Takisto by sa mali zachovať všetky orgány, ktoré vzhľadom na známe vlastnosti testovanej chemikálie možno považovať za cieľové orgány.

66. Tieto tkanivá môžu poskytnúť cenné údaje o účinkoch na endokrinný systém: gonády (vaječníky a semenníky), akcesórne pohlavné orgány (maternica vrátane krčka maternice, nadsemenníky, semenné mechúriky s koagulačnými žľazami, dorzolaterálna a ventrálna prostata), vagína, hypofýza, samčia prsná žľaza a nadoblička. Zmeny na samčích prsných žľazách nie sú dostatočne zdokumentované, ale tento parameter môže byť veľmi citlivý na látky s estrogénovým pôsobením. Skúmanie orgánov/tkanív, ktoré nie sú uvedené v odseku 65, je voliteľné.

67. Mŕtve mláďatá a mláďatá usmrtené na 13. deň po narodení alebo krátko po tomto dni je potrebné prinajmenšom dôkladne preskúmať zvonku na účely zistenia výrazných abnormalít. Je potrebné venovať osobitnú pozornosť vonkajším reprodukčným pohlavným orgánom, ktoré by sa mali vyšetriť na príznaky zmien vo vývoji.

Histopatológia

68. Úplná histopatológia sa uskutoční na uskladnených orgánoch a tkanivách vybratých zvierat v kontrolnej skupine a v skupine s vysokými dávkami (s osobitným dôrazom na štádiá spermatogenézy v samčích gonádach a histopatológiu štruktúry intersticiálnych buniek semenníkov). V prípade potreby sa môže vyšetriť štítna žľaza mláďat a zvyšných dospelých zvierat. Ak sa v skupine s vysokou dávkou zistia zmeny súvisiace s ošetrením, tieto vyšetrenia sa aplikujú aj pri zvieratách zo skupín s odlišnou úrovňou dávok. V usmernení o histopatológii (10) sa uvádzajú ďalšie podrobnosti o disekcii, fixácii, vykonávaní rezov a histopatológii endokrinných tkanív.

69. Všetky závažné lézie je potrebné preskúmať. S cieľom pomôcť pri stanovení úrovní NOAEL je potrebné vyšetriť cieľové orgány v skupinách s odlišnou úrovňou dávok, obzvlášť v skupinách, v ktorých sa uvádza úroveň NOAEL.

▼M8

70. Ak sa použila satelitná skupina, histopatológia sa vykoná na tkanivách a orgánoch, pri ktorých boli v ošetrených skupinách zistené účinky.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje

71. Uvádzajú sa údaje o jednotlivých zvieratách. Okrem toho sa všetky údaje zhrnú v tabuľkovej podobe, kde sa pre každú testovanú skupinu uvedie počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu alebo boli usmrtené z humánnych dôvodov, čas každého úmrtia alebo usmrtenia, počet plodných zvierat, počet gravidných samíc, počet zvierat vykazujúcich príznaky toxicity, opis zistených toxických príznakov vrátane času nástupu, trvania a závažnosti každého toxického účinku, typy histopatologických zmien a všetky relevantné údaje, ktoré sa týkajú vrhu. V dodatku 3 sa uvádza formát súhrnnej správy v tabuľkovej podobe, ktorý sa ukázal ako veľmi užitočný na hodnotenie reprodukčných a vývojových účinkov.

72. Ak je to možné, číselné výsledky sa vyhodnotia vhodnou a všeobecne akceptovateľnou štatistickou metódou. Porovnávanie účinkov podľa rozsahu dávok má zamedziť používaniu opakovaných t-testov. Štatistické metódy by sa mali vybrať počas plánovania štúdie. Štatistická analýza AGD a retenčnej mliečnej cysty vychádza z údajov o jednotlivých mláďatách, pričom sa zohľadňujú vplyvy spojené s vrhom. Ak je to vhodné, jednotkou analýzy je vrh. Štatistická analýza telesnej hmotnosti mláďaťa vychádza z údajov o jednotlivých mláďatách s prihliadnutím na veľkosť vrhu. Vzhľadom na obmedzené rozmery štúdie majú štatistické analýzy vo forme testov „významnosti“ obmedzenú hodnotu v prípade mnohých sledovaných parametrov, najmä reprodukčných sledovaných parametrov. Niektoré z najčastejšie používaných metód, obzvlášť parametrické testy na meranie strednej tendencie, nie sú vhodné. Ak sa použijú štatistické analýzy, vybraná metóda by mala byť vhodná na distribúciu skúmanej premennej a mala by sa zvoliť pred začiatkom štúdie.

Vyhodnotenie výsledkov

73. Zistenia z tejto štúdie toxicity sa majú vyhodnotiť na základe zistených účinkov, pitvy a mikroskopických nálezov. Hodnotenie bude zahŕňať vzťah medzi dávkou testovanej chemikálie a prítomnosťou alebo absenciou abnormalít, početnosťou ich výskytu, ako aj ich závažnosťou, a to vrátane makroskopických lézií, identifikovaných cieľových orgánov, neplodnosti, klinických abnormalít, ovplyvnenej reprodukčnej činnosti a schopnosti vrhnúť, zmien telesnej hmotnosti, účinkov na mortalitu a akýchkoľvek iných toxických účinkov.

74. Z dôvodu krátkeho obdobia ošetrovania samca je pri posudzovaní účinkov na reprodukčnú schopnosť samcov potrebné zvážiť histopatológiu semenníkov a nadsemenníkov spolu s údajmi o plodnosti. Ako pomôcka pri interpretácii štúdie môže byť užitočné aj použitie historických údajov o reprodukcii/vývoji z kontrolných skupín (napr. pokiaľ ide o veľkosť vrhu, AGD, retenčnú mliečnu cystu, hladiny T4 v sére), ak sú k dispozícii.

75. Na účely kontroly kvality sa navrhuje, aby sa zozbierali historické údaje z kontrolných skupín a aby sa vypočítali variačné koeficienty pre číselné údaje, najmä pre parametre spojené s detekciou endokrinného disruptora. Tieto údaje sa môžu použiť pre porovnanie, keď sa vyhodnocujú jednotlivé štúdie.

▼M8

Správa o teste

76. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— zdroj, číslo šarže, konečný dátum použitia, ak sú tieto informácie k dispozícii,

— stabilita testovanej chemikálie, ak je známa.

Jednozložkové látky:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Nosič (v prípade potreby):

— odôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda.

Pokusné zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky umiestnenia, potrava atď.,

— hmotnosť jednotlivých zvierat na začiatku testu,

— odôvodnenie výberu druhu, ak je iný ako potkan.

Podmienky testovania:

— odôvodnenie výberu úrovne dávky,

— údaje o zložení testovanej chemikálie/krmiva, dosiahnutých koncentráciách, stabilite a homogenite prípravku,

▼**M8**

— podrobné údaje o podávaní testovanej chemikálie,

— prepočet koncentrácie testovanej chemikálie v krmive/pitnej vode (ppm) na skutočnú dávku (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), ak sa uplatňuje,

— podrobné údaje o kvalite potravy a vody,

— podrobný opis postupu randomizácie na výber mláďat na utratenie, ak boli utratené.

Výsledky:

— telesná hmotnosť a zmeny telesnej hmotnosti,

— spotreba potravy a spotreba vody, ak sa uplatňuje,

— údaje o toxickej reakcii pri jednotlivých pohlaviach a dávkach vrátane plodnosti, gravidity a akýchkoľvek iných

— toxických príznakov

— dĺžka gravidity, toxické alebo iné účinky na reprodukciu, potomstvo, postnatálny rast atď.,

— povaha, závažnosť a trvanie klinických pozorovaní (údaje o tom, či sú účinky vratné alebo nevratné),

— hodnotenie senzorickej aktivity, sily zovretia a motorickej aktivity,

— hematologické testy s významnými základnými hodnotami,

— testy klinickej biochémie s významnými základnými hodnotami,

— počet dospelých samíc s normálnym alebo abnormálnym estrálnym cyklom a trvanie cyklu,

— počet živonarodených zvierat a straty po implantácii,

— počet mláďat s makroskopicky viditeľnými abnormalitami, všeobecné hodnotenie vonkajších pohlavných orgánov, počet nevyvinutých jedincov,

— čas uhynutia počas štúdie alebo údaj, či zvieratá prežili do usmrtenia,

— počet implantátov, veľkosť vrhu a hmotnosť vrhu v čase zaznamenávania,

— údaje o telesnej hmotnosti mláďat,

— AGD všetkých mláďat (a telesná hmotnosť v deň merania AGD),

— retenčná mliečna cysta pri samčích mláďatách,

— hladiny hormónov štítnej žľazy pri mláďatách na 13. deň a dospelých samcoch (a pri matkách a mláďatách na 4. deň, ak sa uskutočnilo meranie),

— telesná hmotnosť pri usmrtení a údaje o hmotnosti orgánov rodičov,

— pitevné nálezy,

— podrobný opis histopatologických pozorovaní,

— údaje o absorpcii (ak sú k dispozícii),

— štatistické spracovanie výsledkov v prípade potreby.

Rozbor výsledkov.

Závery.

▼M8

Interpretácia výsledkov

77. Štúdia umožní hodnotenia reprodukčnej/vývojovej toxicity v súvislosti s podávaním opakovaných dávok. Keďže dôraz sa kladie na sledované parametre všeobecnej toxicity, ako aj reprodukčnej/vývojovej toxicity, výsledky štúdie predovšetkým umožnia rozlíšenie medzi účinkami na reprodukciu/vývoj, ktoré sa vyskytnú pri neprítomnosti všeobecnej toxicity, a účinkami, ktoré sa prejavujú iba pri dávkach, ktoré sú toxické aj pre rodičovské zvieratá (pozri odseky 7 – 11). Mohlo by to naznačovať potrebu ďalšieho dokazovania a poskytnúť usmernenie pri návrhu ďalších štúdií. Pri interpretácii výsledkov skúmania reprodukcie a vývoja by sa malo nahliadnuť do usmerňovacieho dokumentu OECD 43 (19). V usmerňovacom dokumente OECD č. 106 o histologickom hodnotení endokrinných a reprodukčných testov pri hlodavcoch (16) sa uvádzajú informácie o príprave a hodnotení (endokrinných) orgánov a vaginálnych sterov, ktoré môžu byť užitočné pre túto testovaciu metódu.

LITERATÚRA

(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, s. 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**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV [POZRI AJ USMERŇOVACÍ DOKUMENT OECD Č. 150 (20)]

Androgénny účinok je schopnosť chemikálie pôsobiť v organizme cicavcov ako prirodzený androgénny hormón (napr. testosterón).

Antiandrogénny účinok je schopnosť chemikálie potlačiť v organizme cicavcov pôsobenie prirodzeného androgénneho hormónu (napr. testosterónu).

Antiestrogénový účinok je schopnosť chemikálie potlačiť v organizme cicavcov pôsobenie prirodzeného estrogénového hormónu (napr. estradiolu 17ß).

Antityreoidné pôsobenie je schopnosť chemikálie potlačiť v organizme cicavcov pôsobenie prirodzeného hormónu štítnej žľazy (napr. T_3).

Chemikália je látka alebo zmes.

Vývojová toxicita je prejav reprodukčnej toxicity predstavujúci prenatálne, perinatálne, postnatálne, štrukturálne alebo funkčné poruchy potomstva.

Dávka je množstvo podanej testovanej chemikálie. Dávka je vyjadrená ako hmotnosť testovanej chemikálie na jednotku telesnej hmotnosti pokusného zvieraťa za deň (napr. mg/kg telesnej hmotnosti/deň) alebo ako konštantná koncentrácia v potrave.

Dávkovanie je všeobecný pojem, ktorý zahŕňa dávku, frekvenciu a trvanie podávania dávok.

Zjavná toxicita je všeobecný termín opisujúci jasné toxické príznaky po podaní testovanej chemikálie. Tieto príznaky by mali postačovať na posúdenie nebezpečnosti a pri zvýšení podanej dávky by podľa nich malo byť možné predpokladať výskyt závažných toxických príznakov a pravdepodobnej mortality.

Porucha plodnosti predstavuje poruchy samčích alebo samičích reprodukčných funkcií alebo reprodukčnej schopnosti.

Toxicita v prípade matiek znamená nežiaduce účinky na gravidné samice, ktoré sa vyskytujú buď špecificky (priamy účinok), alebo nešpecificky (nepriamy účinok) a ktoré súvisia so stavom gravidity.

NOAEL je skratka pre hladinu bez pozorovaného nepriaznivého účinku. Je to najvyššia úroveň dávky, pri ktorej po podaní testovanej chemikálie nie sú pozorované žiadne nepriaznivé nálezy.

Estrogénový účinok je schopnosť chemikálie pôsobiť v organizme cicavcov ako prirodzený estrogénový hormón (napr. estradiol 17ß).

Reprodukčná toxicita predstavuje škodlivé účinky na potomstvo a/alebo poruchu samčích alebo samičích reprodukčných funkcií alebo reprodukčnej schopnosti.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

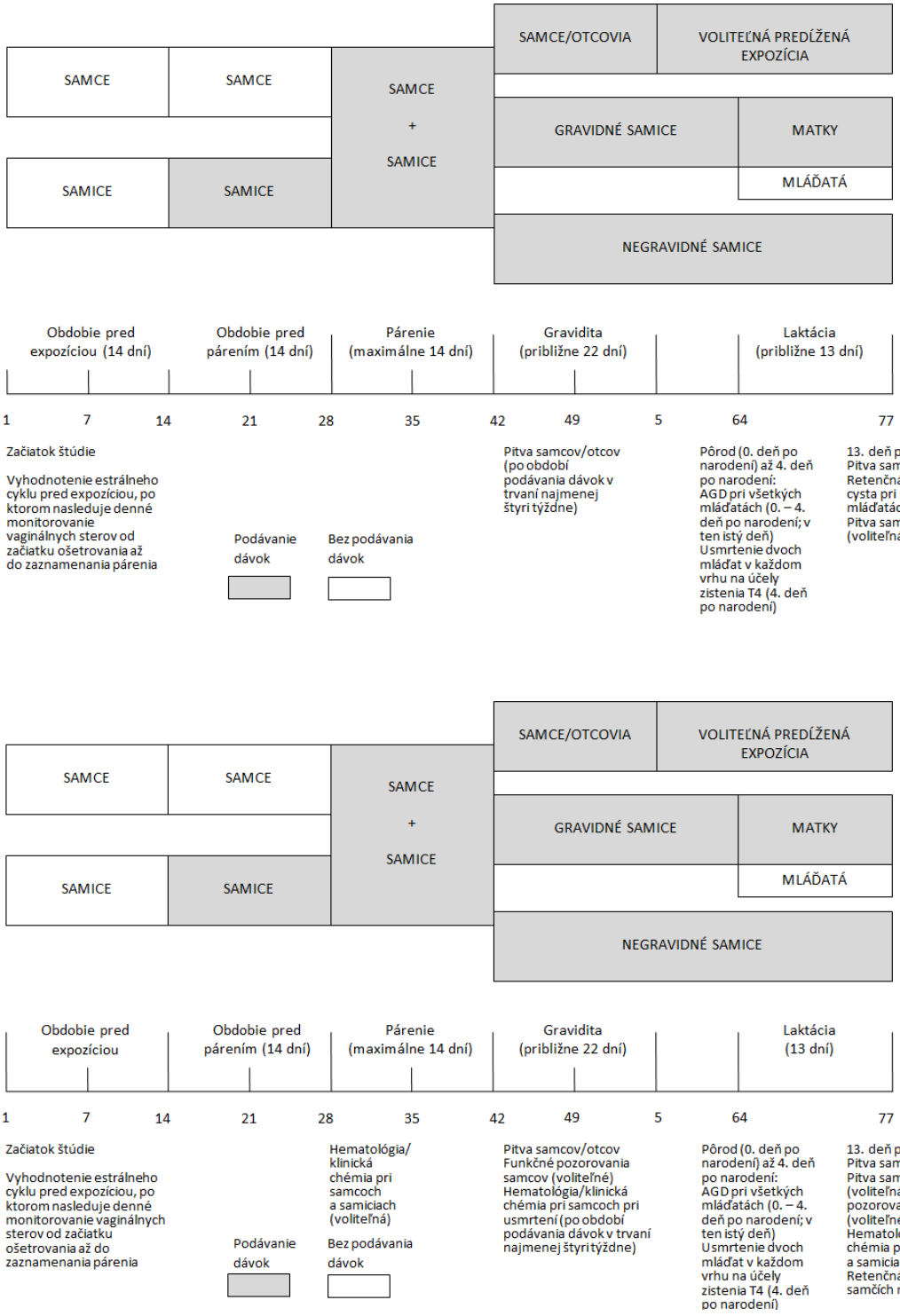
Tyreoidné pôsobenie je schopnosť chemikálie pôsobiť v organizme cicavcov ako prirodzený hormón štítnej žľazy (napr. T_3).

Validácia je vedecký postup určený na charakterizovanie prevádzkových požiadaviek a obmedzení testovacej metódy a na preukázanie jej spoľahlivosti a relevantnosti pre konkrétny účel.

▼**M8**

Dodatok 2

SCHÉMA HARMONOGRAMU TESTU ZNÁZORŇUJÚCA MAXIMÁLNE TRVANIE ŠTÚDIE NA ZÁKLADE ÚPLNÉHO 14-DŇOVÉHO OBDOBIA PÁRENIA



▼**M8**

Dodatok 3

SÚHRNNÁ SPRÁVA V TABUĽKOVEJ PODOBE O ÚČINKOCH NA REPRODUKCIU/VÝVOJ

POZOROVANIA	HODNOTY				
Dávkovanie (jednotky).....	0 (kontrola)	…	…	…	…
Počet párov na začiatku (N)					
Estrálny cyklus (minimálne stredná dĺžka a frekvencia nepravidelných cyklov)					
Samice vykazujúce známky kopulácie (N)					
Samice, pri ktorých nastala gravidita (N)					
Dni počatia 1 – 5 (N)					
Dni počatia 6 –... ([1]) (N)					
Gravidita ≤ 21 dní (N)					
Gravidita = 22 dní (N)					
Gravidita ≥ 23 dní (N)					
Matky so živonarodenými mláďatami (N)					
Matky so živými mláďatami na 4. deň pp (N)					
Počet implantátov na matku (stredná hodnota)					
Počet živých mláďat na matku pri narodení (stredná hodnota)					
Počet živých mláďat na matku na 4. deň (stredná hodnota)					
Pomer pohlaví (samec/samica) pri narodení (stredná hodnota)					
Pomer pohlaví (samec/samica) na 4. deň (stredná hodnota)					
Hmotnosť vrhu pri narodení (stredná hodnota)					
Hmotnosť vrhu na 4. deň (stredná hodnota)					
Hmotnosť mláďat pri narodení (stredná hodnota)					
Hmotnosť mláďat v čase merania AGD (stredná hodnota pri samcoch, stredná hodnota pri samiciach)					
AGD mláďat meraná v rovnaký postnatálny deň, medzi 0. až 4. PND (stredná hodnota pri samcoch, stredná hodnota pri samiciach, zaznamenať PND)					
Hmotnosť mláďat na 4. deň (stredná hodnota)					
Hmotnosť mláďat na 13. deň (stredná hodnota)					

▼M8

POZOROVANIA	HODNOTY				
Retenčná mliečna cysta pri samčích mláďatách na 13. deň (stredná hodnota)					
ABNORMÁLNE MLÁĎATÁ					
Matky s počtom 0					
Matky s počtom 1					
Matky s počtom ≥ 2					
STRATA POTOMSTVA					
Prenatálna (počet implantátov mínus živonarodené mláďatá)					
Samice s počtom 0					
Samice s počtom 1					
Samice s počtom 2					
Samice s počtom ≥ 3					
Postnatálna (životnarodené mláďatá mínus živé mláďatá na 13. postnatálny deň)					
Samice s počtom 0					
Samice s počtom 1					
Samice s počtom 2					
Samice s počtom ≥ 3					

([1]) posledný deň obdobia párenia

▼M8

B.65. METÓDA NA TESTOVANIE POLEPTANIA KOŽE S VYUŽITÍM MEMBRÁNOVEJ BARIÉRY *IN VITRO*

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 435 (2015). Poleptanie kože predstavuje vznik nevratného poškodenia kože, ktoré sa prejavuje ako viditeľná nekróza cez epidermu až do dermy po aplikácii testovanej chemikálie, ako sa vymedzuje v Globálnom harmonizovanom systéme klasifikácie a označovania chemikálií (GHS) Organizácie Spojených národov (OSN) (1) a nariadení Európskej únie (EÚ) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (nariadenie CLP) ([1]). Táto testovacia metóda, ktorá je rovnocenná s aktualizovaným usmernením OECD na vykonávanie testov 435, predstavuje testovaciu metódu s využitím membránovej bariéry *in vitro*, ktorá slúži na identifikáciu žieravých chemikálií. V rámci tejto testovacej metódy sa používa umelá membrána navrhnutá tak, aby na žieravé chemikálie reagovala podobným spôsobom ako koža zvieraťa *in situ*.

2. Žieravosť pre kožu sa tradične posudzuje nanesením testovanej chemikálie na kožu živých zvierat a posúdením rozsahu poškodenia tkaniva po uplynutí stanoveného času (2). Okrem súčasnej testovacej metódy sa prijalo viacero testovacích metód *in vitro*, ktoré predstavujú alternatívy (3) (4) k štandardnému postupu *in vivo* s využitím králičej kože (kapitola B.4 tejto prílohy, ktorá je rovnocenná s usmernením OECD TG 404), ktorý slúži na identifikovanie žieravých chemikálií (2). V stratégii viacúrovňového testovania a hodnotenia podľa GHS OSN pri hodnotení a klasifikácii žieravosti pre kožu a v usmerňovacom dokumente OECD o integrovaných prístupoch k testovaniu a hodnoteniu (IATA) v prípade podráždenia/poleptania kože sa odporúča použitie validovaných a uznaných testovacích metód *in vitro* v rámci modulov 3 a 4 (1) (5). V rámci prístupu IATA sa opisuje viacero modulov, v ktorých sú zoskupené zdroje informácií a analytické nástroje, a i) poskytuje sa usmernenie o tom, ako integrovať a používať existujúce údaje z testovania, ako aj údaje nepochádzajúce z testovania na posúdenie potenciálu chemikálií na spôsobenie podráždenia a poleptania kože; a ii) navrhuje sa prístup v prípade potreby ďalšieho testovania vrátane prípadov, keď sa zistia negatívne výsledky (5). V rámci tohto modulárneho prístupu možno na základe pozitívnych výsledkov z testovacích metód *in vitro* označiť chemikáliu za žieravú bez toho, aby bolo potrebné testovanie na zvieratách, čím sa obmedzí a spresní používanie zvierat a predíde sa bolesti a utrpeniu, ku ktorým by mohlo dôjsť, ak by sa na tento účel používali zvieratá.

3. Pre model s využitím membránovej bariéry *in vitro*, ktorý je komerčne dostupný pod označením Corrositex® (6) (7) (8), sa uskutočnili validačné štúdie, ktorými sa preukázala celková presnosť pri predikcii žieravosti pre kožu na úrovni 79 % (128/163), citlivosť na úrovni 85 % (76/89) a špecifickosť na úrovni 70 % (52/74), a to na základe databázy 163 látok a zmesí (7). Na základe uznanej validity sa táto validovaná referenčná metóda (VRM) odporúča na použitie v rámci viacúrovňovej testovacej stratégie na posudzovanie potenciálu chemikálií, pokiaľ ide o nebezpečenstvo žieravosti pre kožu (5) (7). Skôr ako sa na účely regulácie môže použiť test poleptania kože s využitím membránovej bariéry *in vitro*, je potrebné stanoviť jeho spoľahlivosť, relevantnosť (presnosť) a obmedzenia jeho navrhovaného používania, aby sa zabezpečila jeho podobnosť s metódou VRM (9) v súlade s vopred určenými normami výkonnosti (PS) (10). Vzájomné uznávanie údajov podľa dohody OECD bude možné garantovať len po tom, ako bola akákoľvek nová alebo aktualizovaná metóda v súlade s normami výkonnosti preskúmaná a zaradená do rovnocenného usmernenia OECD na vykonávanie

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006, Ú. v. EÚ L 353/1, 31.12.2008.

▼M8

testov. V súčasnosti usmernenie OECD na vykonávanie testov 435 zahŕňa len jednu metódu *in vitro*, a to túto testovaciu metódu, ktorá je komerčne dostupná ako model Corrositex®.

4. Ostatné metódy na testovanie žieravosti pre kožu sú založené na použití rekonštituovanej ľudskej kože (OECD TG 431) (3) a izolovanej kože potkanov (OECD TG 430) (4). Súčasťou tohto usmernenia na vykonávanie testov je aj zaradenie žieravých chemikálií do troch podkategórií žieravosti podľa GHS OSN a do troch prepravných obalových skupín OSN z hľadiska nebezpečenstva žieravosti. Toto usmernenie na vykonávanie testov sa pôvodne prijalo v roku 2006 a prešlo aktualizáciou v roku 2015, keď sa doň začlenil usmerňovací dokument IATA a aktualizoval sa zoznam látok na preukázanie spôsobilosti.

VYMEDZENIE POJMOV

5. Vymedzenie použitých pojmov sa uvádza v dodatku.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

6. Test opísaný v tejto testovacej metóde umožňuje identifikáciu žieravých testovaných chemikálií a ich ďalšiu klasifikáciu do podkategórií podľa GHS OSN/nariadenia CLP (tabuľka 1). Okrem toho možno pomocou takejto testovacej metódy prijímať rozhodnutia o žieravosti a nežieravosti špecifických tried chemikálií, napr. organických a anorganických kyselín, derivátov kyselín ([1]) a zásad na určité testovacie účely v súvislosti s prepravou (7) (11) (12). V tejto testovacej metóde sa opisuje všeobecný postup podobný validovanej referenčnej testovacej metóde (7). Aj keď táto testovacia metóda neposkytuje primerané informácie o podráždení kože, treba poznamenať, že podráždením kože *in vitro* s vplyvom na zdravie sa konkrétne zaoberá testovacia metóda B.46 (rovnocenná k usmerneniu OECD TG 439) (13). Pokiaľ ide o úplné vyhodnotenie lokálnych účinkov na kožu po jednorazovej dermálnej expozícii, je potrebné použiť usmerňovací dokument OECD o integrovaných prístupoch k hodnoteniu pri vykonávaní testov (5).

Tabuľka 1

Kategória a podkategórie žieravosti pre kožu podľa GHS OSN ([1])

Kategória žieravosti (kategória 1) (pre orgány, ktoré nepoužívajú podkategórie)	Podkategórie potenciálnej žieravosti ([1]) (pre orgány, ktoré používajú podkategórie, vrátane nariadenia CLP)	Žieravé v prípade ≥ 1 z 3 zvierat	
		Expozícia	Pozorovanie
Žieravé	Podkategória žieravosti 1A	≤ 3 minúty	≤ 1 hodina
	Podkategória žieravosti 1B	< 3 minúty/≤ 1 hodina	≤ 14 dní
	Podkategória žieravosti 1C	< 1 hodina/≤ 4 hodiny	≤ 14 dní

([1]) V prípade EÚ sa v nariadení CLP uplatňujú tri podkategórie žieravosti pre kožu 1A, 1B a 1C.

7. Obmedzením validovanej referenčnej metódy (7) je to, že mnohé nežieravé chemikálie a niektoré žieravé chemikálie nemusia splniť požiadavky na testovanie na základe výsledkov počiatočného testu kompatibility (pozri odsek 13). Chemikálie na báze vody s hodnotou pH v rozsahu 4,5 až 8,5

([1]) „Derivát kyseliny“ predstavuje nešpecifické označenie triedy a vo všeobecnosti sa vymedzuje ako chemikália vytvorená z kyseliny, a to buď priamo, alebo pomocou modifikácie alebo čiastočnej substitúcie. Táto trieda zahŕňa anhydridy, halogénkarboxylové kyseliny, soli a iné druhy chemikálií.

▼M8

často nespĺňajú požiadavky na testovanie, no pri testoch na zvieratách sa nežieravosť preukázala v prípade 85 % testovaných chemikálií v uvedenom rozsahu pH (7). Metódu membránovej bariéry *in vitro* možno použiť na testovanie tuhých látok (rozpustných alebo nerozpustných vo vode), kvapalín (vodných alebo nevodných) a emulzií. Testované chemikálie, ktoré nespôsobujú rozpoznateľnú zmenu v teste kompatibility [t. j. zmenu farby v systéme detekcie chemikálií (CDS) validovanej referenčnej testovacej metódy] však nemožno testovať pomocou metódy membránovej bariéry a na ich testovanie je potrebné použiť iné testovacie metódy.

PRINCÍP TESTU

8. Testovací systém je zložený z dvoch zložiek: zo syntetickej makromolekulárnej biobariéry a systému detekcie chemikálií (CDS). Pomocou tejto testovacej metódy sa prostredníctvom systému CDS rozpoznáva narušenie membránovej bariéry spôsobené žieravou testovanou chemikáliou po nanesení testovanej chemikálie na povrch syntetickej makromolekulárnej membránovej bariéry (7), pričom sa predpokladá pôsobenie rovnakých mechanizmov žieravosti ako v prípade kože živého organizmu.

9. Prienik cez membránovú bariéru (alebo jej narušenie) možno merať prostredníctvom viacerých postupov alebo systému CDS, pričom sa sleduje zmena farby farbiva indikátora pH alebo zmena inej vlastnosti roztoku indikátora, ktorý sa nachádza pod bariérou.

10. Je potrebné určiť, že membránová bariéra je platná na zamýšľané použitie, t. j. relevantná a spoľahlivá. V rámci toho je potrebné zabezpečiť, že rozličné prípravky sú konzistentné, pokiaľ ide o vlastnosti bariéry, napr. schopné zabrániť preniknutiu nežieravých chemikálií cez bariéru, umožňujúce kategorizáciu žieravých vlastností chemikálií z hľadiska rôznych podkategórií žieravosti podľa GHS OSN (1). Priradená klasifikácia vychádza z času, ktorý je potrebný na preniknutie chemikálie cez membránovú bariéru k roztoku indikátora.

PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

11. Je potrebné, aby laboratóriá pred začatím bežného používania metódy membránovej bariéry *in vitro*, ktorá spĺňa požiadavky tejto testovacej metódy, preukázali technickú spôsobilosť tak, že správne klasifikujú dvanásť látok na preukázanie spôsobilosti odporúčaných v tabuľke 2. V situáciách, keď látka uvedená v zozname nie je k dispozícii, alebo v odôvodnených prípadoch možno použiť inú látku, pre ktorú sú dostupné primerané referenčné údaje *in vivo* a *in vitro* [napr. zo zoznamu referenčných chemikálií (10)], za predpokladu, že sa uplatňujú rovnaké výberové kritériá, aké sú opísané v tabuľke 1.

Tabuľka 2

Látky na preukázanie spôsobilosti ([1])

Látka ([2])	Registračné číslo CAS	Chemická trieda	Podkategória GHS OSN *in vivo* ([3])	Podkategória GHS OSN *in vitro* ([3])
dihydrát fluoridu boritého	13319-75-0	anorganické kyseliny	1A	1A
kyselina dusičná	7697-37-2	anorganické kyseliny	1A	1A
chlorid fosforečný	10026-13-8	prekurzory anorganických kyselín	1A	1A
valeryl chlorid	638-29-9	chloridy kyselín	1B	1B
hydroxid sodný	1310-73-2	anorganické zásady	1B	1B

▼M8

Látka ([2])	Registračné číslo CAS	Chemická trieda	Podkategória GHS OSN *in vivo* ([3])	Podkategória GHS OSN *in vitro* ([3])
1-(2-aminoetyl)piperazín	140-31-8	alifatické amíny	1B	1B
benzénsulfonylchlorid	98-09-9	chloridy kyselín	1C	1C
N,N-dimetyl benzylamín	103-83-3	anilíny	1C	1C
tetraetylénpentamín	112-57-2	alifatické amíny	1C	1C
eugenol	97-53-0	fenoly	NC	NC
nonylakrylát	2664-55-3	akryláty/metakryláty	NC	NC
hydrogénuhličitan sodný	144-55-8	anorganické soli	NC	NC

([1]) Medzi dvanástimi látkami uvedenými vyššie sa nachádzajú tri látky z každej z troch podkategórií žieravých látok podľa GHS OSN a tri nežieravé látky. Tieto látky sú jednoducho dostupné od komerčných dodávateľov. Podkategória GHS OSN vychádza z výsledkov testovania *in vivo* vysokej kvality. Tieto látky sú vybraté zo zoznamu 40 referenčných látok, ktoré sú súčasťou minimálneho zoznamu chemikálií určených na preukázanie presnosti a spoľahlivosti testovacích metód, ktoré sú štrukturálne a funkčne podobné validovanej referenčnej testovacej metóde, pričom boli zvolené spomedzi 163 referenčných chemikálií, ktoré sa pôvodne použili pri validácii referenčnej testovacej metódy (Corrositex®) (7) (10) (14). Cieľom tohto výberového procesu bolo v maximálnej možnej miere zahrnúť chemikálie, ktoré zastupujú celý rozsah žieravých reakcií (napr. nežieravé látky, žieravé látky podľa obalovej skupiny OSN I, II a III), ktorých meranie alebo predikcia je možná pomocou validovanej referenčnej testovacej metódy, zastupujú chemické triedy použité počas procesu validácie, majú dobre vymedzené chemické štruktúry; vyvolávajú reprodukovateľné výsledky v rámci validovanej referenčnej testovacej metódy, vyvolávajú jednoznačné výsledky v referenčnom teste *in vivo*, sú komerčne dostupné a nie sú spojené s neúmernými nákladmi na zneškodnenie (14).

([2]) Látky testované v čistej podobe alebo s čistotou ≥ 90 %.

([3]) Obalové triedy OSN I, II, resp. III zodpovedajú podkategóriám 1A, 1B, resp. 1C podľa GHS OSN. NC – nežieravé.

POSTUP

12. V nasledujúcich odsekoch sa opisujú zložky a postupy testovacej metódy na posúdenie žieravosti s využitím umelej membránovej bariéry (7) (15) na základe aktuálnej validovanej referenčnej metódy (VRM), t. j. komerčne dostupného modelu Corrositex®. Membránovú bariéru a riešenia týkajúce sa kompatibility/indikátora a kategorizácie možno vytvoriť, pripraviť alebo získať komerčne dostupným spôsobom, ako napríklad v prípade validovanej referenčnej metódy Corrositex®. K dispozícii je vzorový protokol testovacej metódy pre validovanú referenčnú testovaciu metódu (7). Testovanie sa má vykonávať pri teplote okolia (17 – 25 °C) a zložky majú byť v súlade s nasledujúcimi podmienkami.

Test kompatibility s testovanou chemikáliou

13. Pred uskutočnením testu s využitím membránovej bariéry sa uskutoční test kompatibility s cieľom určiť, či je možná detekcia testovanej chemikálie pomocou systému CDS. Ak pomocou systému CDS nie je možná detekcia testovanej chemikálie, testovacia metóda s využitím membránovej bariéry nie je vhodná na posúdenie potenciálnej žieravosti príslušnej testovanej chemikálie a je potrebné použiť inú testovaciu metódu. Systém CDS a podmienky expozície použité v teste kompatibility majú zodpovedať expozícii pri následnom teste s využitím membránovej bariéry.

Test na určenie kategórie časového rámca pre testovanú chemikáliu

14. Ak je to vhodné pre danú testovaciu metódu, testovaná chemikália, ktorá vyhovela v teste kompatibility, sa podrobí testu na určenie kategórie časového rámca, t. j. skríningovému testu na rozlíšenie medzi slabými a silnými kyselinami alebo zásadami. Vo validovanej referenčnej testovacej metóde sa napríklad pomocou testu na určenie kategórie časového rámca stanovuje,

▼M8

ktorý z dvoch časových rámcov sa má použiť podľa toho, či sa zistí významná tlmivá kapacita. Na základe tlmivej kapacity testovanej chemikálie sa používajú dva rôzne časové rámce narušenia bariéry na určenie žieravosti a podkategórie žieravosti pre kožu podľa GHS OSN.

ZLOŽKY TESTOVACEJ METÓDY S VYUŽITÍM MEMBRÁNOVEJ BARIÉRY

Membránová bariéra

15. Membránová bariéra pozostáva z dvoch zložiek: bielkovinového makromolekulárneho vodného gélu a priepustnej podpornej membrány. Bielkovinový gél je nepriepustný pre kvapaliny a pevné látky, ale môže byť narušený žieravinou, čím sa stane priepustným. Úplne zhotovená membránová bariéra sa uloží pri vopred určených podmienkach, aby sa predišlo znehodnoteniu gélu, napr. vysychaním, mikrobiálnym rastom, posunom, prasknutím, čím by sa narušila jeho funkcia. Určí sa prijateľné obdobie skladovania, pričom po jeho uplynutí sa prípravky s membránovou bariérou nemôžu používať.

16. Priepustná podporná membrána slúži ako mechanická opora pre bielkovinový gél počas procesu zgélovatenia a expozície testovanej chemikálii. Podporná membrána bráni poklesu alebo posunu gélu a má byť jednoducho priepustná pre všetky testované chemikálie.

17. Bielkovinový gél zložený z bielkovín, napr. keratínu, kolagénu, alebo zo zmesí bielkovín vytvára gélový podklad, ktorý slúži ako cieľ pre testovanú chemikáliu. Bielkovinový materiál sa umiestni na povrch podpornej membrány a nechá sa zgélovatieť, skôr ako sa membránová bariéra umiestni nad roztok indikátora. Bielkovinový gél má mať všade rovnakú hrúbku a hustotu a nemajú sa v ňom nachádzať vzduchové bubliny ani kazy, ktoré by mohli ovplyvniť jeho funkčnú integritu.

Systém detekcie chemikálií (CDS)

18. Roztok indikátora, ktorý predstavuje rovnaký roztok, aký sa použil pri teste kompatibility, reaguje na prítomnosť testovanej chemikálie. Použije sa farbivo alebo kombinácia farbív indikátora pH, napr. krezolová červeň alebo metyloranž, na ktorej sa prejaví zmena farby ako reakcia na prítomnosť testovanej chemikálie. Systém merania môže byť vizuálny alebo elektronický.

19. Detekčné systémy, ktoré sa vyvíjajú na účely detekcie prechodu testovanej chemikálie cez bariérovú membránu, je potrebné posúdiť z hľadiska relevantnosti a spoľahlivosti, aby sa preukázal rozsah chemikálií, ktoré možno detegovať, a kvantitatívne limity detekcie.

VYKONANIE TESTU

Zostavenie zložiek testovacej metódy

20. Membránová bariéra sa umiestni do nádobky (alebo skúmavky) s roztokom indikátora tak, aby podporná membrána bola úplne v kontakte s roztokom indikátora a neboli prítomné vzduchové bubliny. Je potrebné zabezpečiť, aby sa zachovala integrita bariéry.

▼M8

Aplikácia testovanej chemikálie

21. Vhodné množstvo testovanej chemikálie, napr. 500 µl kvapaliny alebo 500 mg tuhej látky vo forme jemného prášku (7) sa opatrne navrství na vrchný povrch membránovej bariéry a rovnomerne sa rozmiestni. Pripraví sa primeraný počet replikátov, napr. štyri (7), pre každú testovanú chemikáliu a príslušné kontroly (pozri odseky 23 až 25). Zaznamená sa čas aplikácie testovanej chemikálie na membránovú bariéru. S cieľom zabezpečiť správne zaznamenanie krátkych časov poleptania sú časy aplikácie testovanej chemikálie do nádobiek s replikátmi rozložené.

Meranie prienikov cez membránovú bariéru

22. Každá nádobka sa primerane sleduje, zaznamená sa čas prvej zmeny roztoku indikátora, t. j. prieniku cez bariéru, a stanoví sa čas medzi aplikáciou a prienikom cez membránovú bariéru.

Kontroly

23. V testoch, v ktorých sa spolu s testovanou chemikáliou používa nosič alebo rozpúšťadlo, musí byť nosič alebo rozpúšťadlo kompatibilné so systémom membránovej bariéry, t. j. nesmie meniť integritu systému membránovej bariéry ani žieravosť testovanej chemikálie. V relevantných prípadoch sa kontrola s rozpúšťadlom (alebo nosičom) testuje súčasne s testovanou chemikáliou, aby sa preukázala kompatibilita rozpúšťadla so systémom membránovej bariéry.

24. Pozitívna (žieravá) kontrola so strednou žieravosťou, napr. 110 ±15 mg hydroxidu sodného (podkategória žieravosti 1B podľa GHS OSN) (7) sa má testovať súčasne s testovanou chemikáliou s cieľom posúdiť prijateľnú funkčnosť testovacieho systému. Druhá pozitívna kontrola, ktorá patrí do rovnakej chemickej triedy ako testovaná chemikália, môže byť užitočná na vyhodnotenie relatívnych žieravých vlastností žieravej testovanej chemikálie. Je potrebné vybrať pozitívne kontroly, ktoré majú strednú žieravosť (napr. podkategória 1B podľa GHS OSN), s cieľom detegovať zmeny v čase prieniku, ktorý môže byť neprijateľne dlhší alebo kratší než určená referenčná hodnota, čo by poukazovalo na nesprávnu činnosť testovacieho systému. Na tento účel sú vysoko žieravé (podkategória 1A podľa GHS OSN) alebo nežieravé chemikálie užitočné len v obmedzenej miere. Žieravá chemikália patriaca do podkategórie 1B podľa GHS OSN umožňuje detekciu príliš krátkeho alebo príliš dlhého času narušenia bariéry. Slabo žieravú chemikáliu (podkategória 1C podľa GHS OSN) možno použiť ako pozitívnu kontrolu na meranie schopnosti testovacej metódy konzistentne rozlišovať medzi slabo žieravými a nežieravými chemikáliami. Bez ohľadu na použitý prístup je potrebné vytvoriť prijateľný rozsah reakcií na pozitívnu kontrolu na základe historického rozsahu časov narušenia bariéry pre použité pozitívne kontroly, napr. stredná hodnota ±2 – 3 štandardné odchýlky. V jednotlivých štúdiách je potrebné pre každú pozitívnu kontrolu určiť presný čas narušenia bariéry, aby bola možná detekcia odchýlok, ktoré sú mimo prijateľného rozsahu.

25. Negatívna (nežieravá) kontrola, napr. 10 % kyselina citrónová, 6 % kyselina propiónová (7), sa má takisto testovať súčasne s testovanou chemikáliou ako ďalšie opatrenie v rámci kontroly kvality s cieľom preukázať funkčnú integritu membránovej bariéry.

▼M8

Kritériá prijateľnosti štúdie

26. Podľa stanovených časových parametrov pre jednotlivé podkategórie žieravosti podľa GHS OSN sa na predikciu žieravosti testovanej chemikálie používa čas (v minútach), ktorý uplynul medzi aplikáciou testovanej chemikálie na membránovú bariéru a prienikom cez túto bariéru. Na to, aby sa štúdia považovala za prijateľnú, sa musí prostredníctvom súbežnej pozitívnej kontroly dosiahnuť očakávaný čas odozvy pri prieniku (napr. čas narušenia bariéry 8 – 16 minút, ak sa ako pozitívna kontrola používa hydroxid sodný), súbežná negatívna kontrola nesmie byť žieravá a súbežná kontrola s aplikáciou rozpúšťadla, ak sa používa, nemá byť ani žieravá, ani nemá meniť žieravé vlastnosti testovanej chemikálie. Je potrebné, aby laboratóriá pred začatím bežného používania metódy, ktorá spĺňa požiadavky tejto testovacej metódy, preukázali technickú spôsobilosť pomocou dvanástich látok odporúčaných v tabuľke 2. Pri nových podobných metódach („me-too“) vyvinutých v rámci tejto testovacej metódy, ktoré sú štrukturálne a funkčne podobné validovanej referenčnej metóde (14), by sa mali použiť vopred určené normy výkonnosti na preukázanie spoľahlivosti a presnosti novej metódy pred tým, ako sa začne používať na regulačné testovanie (10).

Interpretácia výsledkov a klasifikácia žieravosti testovaných chemikálií

27. Čas (v minútach), ktorý uplynul medzi aplikáciou testovanej chemikálie na membránovú bariéru a prienikom cez túto bariéru, slúži na klasifikáciu testovanej chemikálie z hľadiska podkategórií žieravosti podľa GHS OSN (1) a v relevantných prípadoch z hľadiska obalovej skupiny OSN (16). Pre jednotlivé navrhované testovacie metódy sa stanovujú hraničné časové hodnoty pre každú z troch podkategórií žieravosti. Pri konečnom rozhodnutí o hraničných časových hodnotách je potrebné zohľadniť to, aby sa minimalizovala možnosť nedostatočnej klasifikácie nebezpečnosti z hľadiska žieravosti (t. j. falošne negatívne výsledky). V súčasnom usmernení na vykonávanie testov sa majú použiť hraničné časové hodnoty modelu Corrositex® opísané v tabuľke 3, keďže tento model predstavuje jedinú testovaciu metódu, ktorá v súčasnosti patrí do tohto usmernenia na vykonávanie testov (7).

Tabuľka 3

Predikčný model Corrositex®

Stredný čas narušenia bariéry (min.)		Predikcia podľa GHS OSN ([3])
Testovaná chemikália kategórie 1 ([1]) (určená kategorizačným testom metódy)	Testovaná chemikália kategórie 2 ([2]) (určená kategorizačným testom metódy)	
0 – 3 min.	0 – 3 min.	žieravá voliteľná podkategória 1A
< 3 až 60 min.	< 3 až 30 min.	žieravá voliteľná podkategória 1B
< 60 až 240 min.	< 30 až 60 min.	žieravá voliteľná podkategória 1C
< 240 min.	< 60 min.	nežieravá

([1]) Testovaná chemikália s vysokou tlmivou kapacitou (6)
([2]) Testovaná chemikália s nízkou tlmivou kapacitou (6)
([3]) Podkategórie 1A, 1B, resp. 1C podľa GHS OSN zodpovedajú obalovým skupinám OSN I, II, resp. III.

▼**M8**

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje

28. Čas (v minútach), ktorý uplynul medzi aplikáciou a prienikom cez bariéru sa pre testovanú chemikáliu a pozitívne kontroly uvádza v tabuľkovej podobe ako údaje o jednotlivých replikátoch, ako aj stredné hodnoty ± štandardnej odchýlky pre každý test.

Správa o teste

29. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália a kontrolné látky:

— jednozložková látka: identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— viaczložkové látky, UVCB a zmesi: charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— zdroj, číslo dávky, ak je k dispozícii,

— prípadná úprava testovanej chemikálie/kontrolnej látky pred testovaním (napr. zahrievanie, drvenie),

— stabilita testovanej chemikálie, konečný dátum použitia alebo dátum opätovnej analýzy, ak sú známe,

— podmienky skladovania.

Nosič:

— identifikácia, koncentrácia (ak je to vhodné), použitý objem,

— zdôvodnenie výberu nosiča.

Model membránovej bariéry in vitro a použitý protokol vrátane preukázanej presnosti a spoľahlivosti

Podmienky testovania:

— opis použitých prístrojov a postupov prípravy,

— zdroj a zloženie použitej membránovej bariéry *in vitro*,

— zloženie a vlastnosti roztoku indikátora,

— metóda detekcie,

— množstvá testovanej chemikálie a kontrolných látok,

— počet replikátov,

— opis a odôvodnenie testu na určenie kategórie časového rámca,

▼**M8**

— metóda aplikácie,

— časy pozorovania,

— opis použitých kritérií hodnotenia a klasifikácie,

— preukázanie spôsobilosti pri vykonávaní testovacej metódy pred začatím bežného používania otestovaním chemických látok na preukázanie spôsobilosti.

Výsledky:

— individuálne nespracované údaje z jednotlivých testovacích a kontrolných vzoriek pre každý replikát v podobe tabuľky,

— opis ďalších pozorovaných účinkov,

— odvodená klasifikácia s prihliadnutím na použitý predikčný model/rozhodovacie kritériá.

Rozbor výsledkov

Závery

LITERATÚRA

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. K dispozícii na adrese: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Kapitola B.4 tejto prílohy, Akútne podráždenie/poleptanie kože.

(3) Kapitola B.40a tejto prílohy, Poleptanie kože *in vitro*: Testovacia metóda pomocou zrekonštruovanej ľudskej epidermy (RHE).

(4) Kapitola B.40 tejto prílohy, Poleptanie kože *in vitro*: Transkutánny elektrický odpor (TER).

(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. K dispozícii na adrese: 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) Kapitola B.46 tejto prílohy, Podráždenie kože *in vitro*: Test na modeli rekonštruovanej ľudskej pokožky. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. K dispozícii na adrese: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. K dispozícii na adrese: 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. K dispozícii na adrese: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

▼M8

Dodatok

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o mieru výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom zhoda a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (9).

Chemikália: látka alebo zmes.

Systém detekcie chemikálií (CDS): systém vizuálneho alebo elektronického merania s roztokom indikátora, ktorý reaguje na prítomnosť testovanej chemikálie, napr. zmenou vo farbive alebo v kombinácii farbív indikátora pH, prostredníctvom ktorej sa prejaví zmena farby ako reakcia na prítomnosť testovanej chemikálie, alebo inými typmi chemických alebo elektrochemických reakcií.

Zhoda: ide o mieru výkonnosti testovacej metódy pre testovacie metódy, ktoré poskytujú kategorizačné výsledky, a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa niekedy používa zameniteľne s pojmom presnosť a je vymedzený ako podiel všetkých testovaných chemikálií, ktoré sú správne klasifikované ako pozitívne alebo negatívne. Zhoda je vo veľkej miere závislá od prevalencie pozitívnych výsledkov v typoch skúmaných testovaných chemikálií (9).

GHS (Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemických látok): systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálnej, zdravotnej a environmentálnej nebezpečnosti a ich označovanie zodpovedajúcimi komunikačnými prvkami, ako sú piktogramy, výstražné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o nepriaznivých účinkoch daných chemikálií v záujme ochrany osôb (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a subjektov reakcie na núdzové situácie) a životného prostredia (1).

IATA: integrovaný prístup k testovaniu a hodnoteniu.

Zmes: zmes alebo roztok zložený z dvoch alebo viacerých látok.

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej 80 hm %.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii $\geq$ 10 hm. % a $<$ 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo k chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

NC: nežieravé.

Normy výkonnosti: normy založené na validovanej testovacej metóde, ktoré slúžia ako základ na hodnotenie porovnateľnosti navrhovanej testovacej metódy, ktorá je mechanicky a funkčne podobná. Patria sem: i) nevyhnutné zložky testovacej metódy; ii) minimálny zoznam referenčných chemikálií vybraných spomedzi látok používaných na preukázanie prijateľnej výkonnosti validovanej testovacej metódy a iii) podobné úrovne spoľahlivosti a presnosti založené na tom, čo sa získalo pri validovanej testovacej metóde, ktoré by navrhovaná testovacia metóda mala preukázať pri hodnotení pomocou minimálneho zoznamu referenčných chemikálií (9).

▼**M8**

Relevantnosť: opis vzťahu testovacej metódy k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej sa testovacou metódou správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testovacej metódy (9).

Spoľahlivosť: vyjadruje rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti (9).

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií správne klasifikovaných testovacou metódou. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky, a ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (9).

Poleptanie kože *in vivo*: vznik nevratného poškodenia kože; konkrétne ide o viditeľnú nekrózu cez epidermu až do dermy po aplikácii testovanej chemikálie, a to až do štyroch hodín. Pre reakcie v dôsledku poleptania sú typické vredy, krvácanie, krvavé chrasty a na konci pozorovania po 14 dňoch strata farby v dôsledku vyblednutia kože, celé plochy postihnuté alopéciou a jazvy. Na vyhodnotenie problematických lézií by sa malo uvažovať o histopatológii.

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií správne klasifikovaných testovacou metódou. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky, a ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (9).

Látka: chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie ich stability a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ktorý však nezahŕňa žiadne rozpúšťadlá, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo zmeny jej zloženia.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

▼M8

B.66. **STABILNE TRANSFEKTOVANÁ TRANSAKTIVÁCIA V SKÚŠKACH *IN VITRO* NA ZISŤOVANIE AGONISTOV A ANTAGONISTOV ESTROGÉNOVÝCH RECEPTOROV**

VŠEOBECNÝ ÚVOD

Usmernenia OECD na vykonávanie testov výkonnosti

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 455 (2016). TG 455 je usmernenie na vykonávanie testov výkonnosti (PBTG), v ktorom sa opisuje metodika stabilne transfektovanej transaktivácie v skúškach *in vitro* na určovanie agonistov a antagonistov estrogénových receptorov (skúšky ER TA). Obsahuje niekoľko mechanicky a funkčne podobných testovacích metód na identifikáciu agonistov a antagonistov estrogénových receptorov (t. j. ERα, a/alebo ERβ) a malo by uľahčiť vývoj nových podobných alebo modifikovaných testovacích metód v súlade so zásadami validácie stanovenými v usmerňovacom dokumente OECD o validácii a medzinárodnom uznávaní nových a aktualizovaných testovacích metód na posúdenie nebezpečnosti (1). Plne validované referenčné testovacie metódy (dodatok 2 a dodatok 3), ktoré poskytujú základ pre toto PBTG, sú:

   — skúška stabilne transfektovanej transaktivácie (STTA) (2) s použitím bunkovej línie (h) ERα-HeLa-9903, a

   — skúška VM7Luc ER TA (3) s použitím bunkovej línie VM7Luc4E2 ([1]), ktorá vyjadruje najmä hERα s určitým prírastkom z hERββ(4)(5).

   Na vývoj a validáciu podobných skúšok zameraných na rovnaký sledovaný parameter nebezpečenstva sú k dispozícii a mali by sa používať normy výkonnosti (PS) (6) (7). Umožňujú včasnú zmenu PBTG 455 tak, aby bolo možné k aktualizovanému PBTG pridať nové podobné skúšky. Podobné skúšky sa však pridajú až po preskúmaní a súhlase zo strany OECD, že sú splnené normy výkonnosti. Skúšky zahrnuté do TG 455 môžu byť použité bez rozdielu na riešenie požiadaviek členských štátov OECD týkajúcich sa výsledkov testov na transaktiváciu estrogénových receptorov, pričom sa v nich využíva vzájomné uznávanie údajov OECD.

Súvislosti a zásady skúšok zahrnutých do tejto testovacej metódy

2. OECD v roku 1998 začala činnosť s vysokou prioritou s cieľom vykonať revíziu existujúcich usmernení a vypracovať nové usmernenia na vykonávanie testov na skríning a testovanie potenciálnych endokrinných disruptorov. Koncepčný rámec OECD na testovanie a hodnotenie

([1]) Pred júnom 2016 bola táto bunková línia označená ako bunková línia BG1Luc. Bunky BG-1 pôvodne opísal Geisinger a kol. (1998) (35) a neskôr boli charakterizované výskumníkmi z National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (36). Relatívne nedávno sa zistilo, že existujú dva odlišné varianty buniek BG-1, ktoré používajú výskumníci, a to BG-1 Fr a BG-1 NIEHS. Z hĺbkovej analýzy (vrátane testovania DNA) týchto dvoch variantov bunkových línií BG-1, ktoré vykonal Li a spolupracovníci (2014) (37), vyplynulo, že BG-1 Fr je jedinečná a že BG-1 NIEHS, teda pôvodná bunková línia, ktorá sa pri skúške používala, nie je bunkovou líniou ľudského karcinómu vaječníkov BG1, ale variantom bunkovej línie ľudského karcinómu prsníka MCF7. Bunková línia použitá v skúške, pôvodne označovaná ako BG1Luc4E2 (38), sa už bude označovať ako VM7Luc4E2 („V“ = variant; „M7“ = bunky MCF7). Podobne skúška sa bude odteraz označovať ako VM7Luc ER TA. Zatiaľ čo týmto sa mení pôvod bunkovej línie, na ktorej je skúška založená, nemá to vplyv na publikované validačné štúdie ani na použitie a aplikáciu tejto skúšky na skríning estrogénových/antiestrogénových chemikálií.

▼M8

potenciálnych endokrinných disruptorov bol revidovaný v roku 2012. Pôvodné a revidované koncepčné rámce sú zahrnuté ako prílohy k usmerňovaciemu dokumentu OECD o štandardizovaných usmerneniach na vykonávanie testov na hodnotenie chemikálií ako endokrinných disruptorov (8). Koncepčný rámec tvorí päť úrovní, každá úroveň zodpovedá odlišnej úrovni biologickej zložitosti. Skúšky transaktivácie (TA) estrogénových receptorov opísané v tejto testovacej metóde predstavujú úroveň 2, čo zahŕňa „skúšky *in vitro* poskytujúce údaje o vybraných endokrinných mechanizmoch/dráhach“. Táto testovacia metóda je určená pre skúšky transaktivácie (TA) *in vitro* určené na identifikáciu agonistov a antagonistov estrogénových receptorov (ER).

3. Interakcia estrogénov s estrogénovými receptormi môže ovplyvniť transkripciu génov riadených estrogénom, čo môže viesť k indukcii alebo inhibícii bunkových procesov vrátane tých, ktoré sú potrebné na proliferáciu buniek, normálny vývoj plodu a reprodukčnú funkciu (9) (10) (11). Porušenie normálnych estrogénových systémov môže potenciálne spustiť nežiaduce účinky na normálny vývoj (ontogenézu), reprodukčné zdravie a integritu reprodukčného systému.

4. Skúšky transaktivácie *in vitro* sú založené na priamej alebo nepriamej interakcii látok so špecifickým receptorom, ktorý reguluje transkripciu reportérového génového produktu. Takéto skúšky sa vo veľkej miere používajú na hodnotenie expresie génov regulovanej špecifickými jadrovými receptormi, ako sú estrogénové receptory (12) (13) (14) (15) (16). Boli navrhnuté na detekciu estrogénovej transaktivácie regulovanej estrogénovými receptormi (17) (18) (19). Existujú najmenej dva hlavné podtypy jadrových estrogénových receptorov, ERα a ERβ, ktoré sú zakódované odlišnými génmi. Príslušné proteíny majú rôzne biologické funkcie, ako aj rôznu distribúciu v tkanivách a ligandové afinity (20)(21)(22)(23)(24)(25)(26). Jadrový ERα sprostredkuje klasickú estrogénovú reakciu (27) (28) (29) (30), a preto väčšina modelov, ktoré sa v súčasnosti vyvíjajú na meranie aktivácie alebo inhibície estrogénových receptorov, sú špecifické pre ERα. Tieto skúšky sa používajú na identifikáciu chemikálií, ktoré aktivujú (alebo inhibujú) estrogénové receptory po naviazaní ligandov, po ktorom sa komplex receptora a ligandu naviaže na konkrétne úseky DNA zodpovedné za reakciu a transaktivuje reportérový gén, čo vedie k zvýšenej bunkovej expresii markerového proteínu. V skúškach sa môžu použiť rôzne reportérové reakcie. V systémoch založených na luciferáze enzým luciferáza transformuje luciferínový substrát na bioluminiscenčný produkt, ktorý možno kvantitatívne merať luminometrom. Inými príkladmi bežných reportérov sú fluorescenčný proteín a gén *LacZ*, ktorý kóduje β-galaktozidázu, enzým, ktorý dokáže transformovať bezfarebný substrát X-gal (5-bróm-4-chlórindolylgalaktopyranozid) na modrý produkt, ktorý možno kvantifikovať spektrofotometrom. Tieto reportérové gény možno hodnotiť rýchlo a lacno pomocou komerčne dostupných testovacích súprav.

5. Validačné štúdie skúšok STTA a VM7Luc TA preukázali ich význam a spoľahlivosť, pokiaľ ide o ich určený účel (3)(4)(5)(30). Normy výkonnosti pre skúšky transaktivácie estrogénových receptorov (ER TA) založené na luminiscencii s použitím bunkových línií prsníka sú zahrnuté v hodnotiacej správe výboru ICCVAM o testovacej metóde LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): Skúška *in vitro* na určenie agonistického a antagonistického pôsobenia chemikálií na estrogénové receptory ľudí [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). Tieto normy výkonnosti boli upravené tak, aby boli použiteľné pre skúšky STTA aj VM7Luc TA (2).

6. Vymedzenie pojmov a skratky použité v tejto testovacej metóde sú uvedené v dodatku 1.

▼M8

Rozsah a obmedzenia týkajúce sa skúšok transaktivácie

7. Tieto skúšky sa navrhujú na účely skríningu a stanovovania priorít, ale môžu poskytnúť aj mechanistické informácie, ktoré možno použiť v analýze váhy dôkazov. Týkajú sa transaktivácie indukovanej chemickou väzbou na estrogénové receptory v systéme *in vitro*. Výsledky by teda nemali byť priamo extrapolované na komplexnú signalizáciu a reguláciu intaktného endokrinného systému *in vivo*.

8. Transaktivácia, ktorú sprostredkujú estrogénové receptory, sa považuje za jeden z kľúčových mechanizmov narušenia endokrinného systému (ED), hoci existujú aj iné mechanizmy, prostredníctvom ktorých môže dôjsť k narušeniu endokrinného systému, okrem iného napríklad prostredníctvom i) interakcií s inými receptormi a enzýmovými systémami v rámci endokrinného systému; ii) hormónovej syntézy; iii) metabolickej aktivácie a/alebo inaktivácie hormónov; iv) distribúcie hormónov do cieľových tkanív a v) vylúčenia hormónov z tela. Žiadna zo skúšok v rámci tejto testovacej metódy sa netýka týchto spôsobov účinku.

9. Táto testovacia metóda sa týka schopnosti chemikálií aktivovať (teda pôsobiť ako agonisty) a takisto potlačiť (teda pôsobiť ako antagonisty) transkripciu závislú od estrogénových receptorov. Niektoré chemikálie môžu v závislosti od typu buniek vykazovať agonistické aj antagonistické pôsobenie a sú známe ako selektívne modulátory estrogénových receptorov (SERM). Chemikálie, pri ktorých sa v týchto skúškach dosiahnu negatívne výsledky, by sa mohli vyhodnotiť v skúške viazania na estrogénové receptory, skôr než sa vyvodí záver, že daná chemikália sa na receptor neviaže. Okrem toho skúšky pravdepodobne informujú len o aktivite materskej molekuly so zreteľom na obmedzené metabolizačné kapacity bunkových systémov *in vitro*. Vzhľadom na to, že počas validácie boli použité iba jednotlivé látky, neriešila sa použiteľnosť na testované zmesi. Táto testovacia metóda je napriek tomu teoreticky použiteľná aj na testovanie viaczložkových látok, UVCB a zmesí. Pred použitím tejto testovacej metódy na viaczložkovej látke, UVCB alebo zmesi s cieľom generovať údaje plánované na regulačné účely by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na tento účel, a ak áno, tak prečo. Takéto úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi.

10. Na informačné účely tabuľka 1 poskytuje výsledky testov agonistov pre 34 látok, ktoré boli testované v obidvoch plne validovaných referenčných testovacích metódach opísaných v tejto testovacej metóde. Z týchto látok je 26 klasifikovaných ako definitívne agonisty estrogénových receptorov a 8 je klasifikovaných ako negatívne na základe publikovaných správ vrátane skúšok *in vitro* viazania na estrogénové receptory a skúšky transaktivácie a/alebo uterotrofickej skúšky (2)(3)(18)(31)(32)(33)(34). V tabuľke 2 sa nachádzajú výsledky testov antagonistov pre 15 látok, ktoré boli testované v obidvoch plne validovaných referenčných testovacích metódach opísaných v tejto testovacej metóde. Z týchto látok sú 4 klasifikované ako definitívne/predpokladané antagonisty estrogénových receptorov a 10 je klasifikovaných ako negatívne na základe publikovaných správ vrátane skúšok *in vitro* viazania na estrogénové receptory a skúšky transaktivácie (2)(3)(18)(31). V súvislosti s údajmi zhrnutými v tabuľke 1 a tabuľke 2 existovala 100 % zhoda medzi oboma referenčnými testovacími metódami, pokiaľ ide o klasifikáciu všetkých látok, s výnimkou jednej látky (mifepristónu), v prípade skúšky antagonistov, pričom každá látka bola správne klasifikovaná ako agonista/antagonista estrogénových receptorov alebo ako negatívna. Doplňujúce informácie o tejto skupine chemikálií, ako aj o ďalších chemikáliách testovaných v skúškach STTA a VM7Luc ER TA počas validačných štúdií sú uvedené v normách výkonnosti pre ERTA (6)(7), v dodatku 2 (tabuľky 1, 2 a 3).

▼M8

Tabuľka 1

Prehľad výsledkov zo skúšok STTA a VM7Luc ER TA pre látky testované v obidvoch skúškach agonistov a klasifikované ako agonisty estrogénových receptorov (POS) alebo ako negatívne (NEG)

	Látka	Registračné číslo CAS	Skúška STTA (1)			Skúška VM7Luc ER TA (2)		Zdroj údajov pre klasifikáciu (4)		
			Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota PC_{10} (M)	Hodnota PC_{50} (b) (M)	Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota EC_{50} (b), (3) (M)	Iné transaktivácie ER (1)	Viazanie na ER	Uterotrofické pôsobenie
1	17ß-estradiol (a)	50-28-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$5{,}63 \times 10^{-12}$	POS (227/227)	POS	POS
2	17α-estradiol (a)	57-91-0	POS	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}40 \times 10^{-9}$	POS(11/11)	POS	POS
3	17α-etinylestradiol (a)	57-63-6	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$7{,}31 \times 10^{-12}$	POS(22/22)	POS	POS
4	17β-trenbolón	10161-33-8	POS	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	POS	$4{,}20 \times 10^{-8}$	POS (2/2)	NT	NT
5	19-nortestosterón (a)	434-22-0	POS	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}80 \times 10^{-6}$	POS(4/4)	POS	POS
6	4-kumylfenol (a)	599-64-4	POS	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}20 \times 10^{-7}$	POS(5/5)	POS	NT
7	4-*terc*-oktylfenol (a)	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	POS	$3{,}19 \times 10^{-8}$	POS(21/24)	POS	POS
8	apigenín (a)	520-36-5	POS	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS(26/26)	POS	NT
9	atrazín (a)	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Bisfenol A (a)	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	POS	$5{,}33 \times 10^{-7}$	POS (65/65)	POS	POS
11	Bisfenol B (a)	77-40-7	POS	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}95 \times 10^{-7}$	POS(6/6)	POS	POS
12	Butylbenzyl ftalát (a)	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}98 \times 10^{-6}$	POS(12/14)	POS	NEG

▼M8

	Látka	Registračné číslo CAS	Skúška STTA [1]			Skúška VM7Luc ER TA [2]		Zdroj údajov pre klasifikáciu [4]		
			Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota PC_{10} (M)	Hodnota PC_{50} [b] (M)	Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota EC_{50} [b], [3] (M)	Iné transaktivácie ER [1]	Viazanie na ER	Uterotrofické pôsobenie
13	kortikosterón [a]	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG(6/6)	NEG	NT
14	kumestrol [a]	479-13-0	POS	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	POS	$1{,}32 \times 10^{-7}$	POS(30/30)	POS	NT
15	daidzeín [a]	486-66-8	POS	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	POS	$7{,}95 \times 10^{-7}$	POS(39/39)	POS	POS
16	dietylstilbestrol [a]	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	POS	$3{,}34 \times 10^{-11}$	POS(42/42)	POS	NT
17	di-n-butyl ftalát	84-74-2	POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POS(6/11)	POS	NEG
18	etylparabén	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(bez hodnoty PC_{50})	POS	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POS		NT
19	estrón [a]	53-16-7	POS	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	POS	$2{,}34 \times 10^{-10}$	POS(26/28)	POS	POS
20	genisteín [a]	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	POS	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS(100/102)	POS	POS
21	haloperidol	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
22	kaempferol [a]	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POS(23/23)	POS	NT
23	kepon [a]	143-50-0	POS	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS(14/18)	POS	NT
24	ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
25	linuron [a]	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NT
26	*mezo*-hexestrol [a]	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POS	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POS(4/4)	POS	NT
27	metyl testosterón [a]	58-18-4	POS	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}68 \times 10^{-6}$	POS(5/6)	POS	NT

▼M8

	Látka	Registračné číslo CAS	Skúška STTA ([1])			Skúška VM7Luc ER TA ([2])		Zdroj údajov pre klasifikáciu ([4])		
			Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota PC_{10} (M)	Hodnota PC_{50} ([b]) (M)	Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota EC_{50} ([b]), ([3]) (M)	Iné transaktivácie ER ([1])	Viazanie na ER	Uterotrofické pôsobenie
28	morín	480-16-0	POS	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}37 \times 10^{-6}$	POS(2/2)	POS	NT
29	noretynodrel ([a])	68-23-5	POS	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	POS	$9{,}39 \times 10^{-10}$	POS(5/5)	POS	NT
30	*p,p'*-metoxychlór ([a])	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(bez hodnoty PC_{50}) ([a])	POS	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POS(24/27)	POS	POS
31	fenobarbital ([a])	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG(2/2)	NEG	NT
32	reserpín	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG(4/4)	NEG	NT
33	spironolaktón ([a])	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG(4/4)	NEG	NT
34	testosterón	58-22-0	POS	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}75 \times 10^{-5}$	POS(5/10)	POS	NT

Skratky: Registračné číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service); M = molárna; EC_{50} = polovičná maximálna účinná koncentrácia testovanej látky; NEG = negatívna; POS = pozitívna; NT = netestované; PC_{10} (a PC_{50}) = koncentrácia testovanej látky, pri ktorej reakcia predstavuje 10 % (alebo 50 % v prípade PC_{50}) reakcie vyvolanej pozitívnou kontrolou (E2, 1 nm) na každej mikrotitračnej platničke.

([a]) Bežné látky testované v skúškach STTA a VM7Luc ER TA, ktoré boli označené ako agonisty estrogénových receptorov alebo ako negatívne a ktoré boli použité na vyhodnotenie presnosti vo validačnej štúdii VM7Luc ER TA [Hodnotiaca správa výboru ICCVAM o testovacej metóde VM7Luc ER TA, tabuľka 4-1 (3)].

([b]) Maximálna koncentrácia testovaná za neprítomnosti obmedzení v dôsledku cytotoxicity alebo nerozpustnosti bola 1×10^{-5} M (skúška STTA) a 1×10^{-3} M (skúška VM7Luc ER TA).

([c]) Číslo v zátvorkách predstavuje výsledky testov, na základe ktorých je látka klasifikovaná ako pozitívna (POS) alebo negatívna (NEG), z celkového počtu referenčných štúdií.

([1]) Hodnoty uvedené v návrhu správy o predbežnej validácii a medzilaboratórnej validácii skúšky stabilne transfektovanej transkripčnej aktivácie (TA) na stanovenie estrogénového pôsobenia – skúška reportérového génu, ktorého mediátorom je ľudský ERα, s použitím bunkovej línie hER-HeLa-9903 [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]) Hodnotiaca správa výboru ICCVAM o testovacej metóde LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): Metóda *in vitro* na určenie agonistov a antagonistov ER: [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]) Stredné hodnoty EC_{50} sa vypočítali na základe hodnôt, ktoré uviedli laboratóriá validačnej štúdie VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, a Hiyoshi) (3).

([4]) Klasifikácia látky ako agonistu estrogénových receptorov alebo ako látky, ktorá je negatívna, vychádzala z informácií uvedených v podkladových kontrolných dokumentoch (Background Review Document – BRD) výboru ICCVAM pre testovacie metódy viazania na estrogénové receptory a testovacie metódy transaktivácie (TA) (31), ako aj z informácií získaných z publikácií publikovaných a revidovaných po dokončení podkladových kontrolných dokumentov výboru ICCVAM (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Poznámky: Jednotlivé skúšky v rámci tejto testovacej metódy nemajú rovnaké merania. V niektorých situáciách EC_{50} nie je možné vypočítať, pretože nie je generovaná úplná krivka závislosti odozvy od dávky. Zatiaľ čo pri skúške STTA je hodnota PC_{10} kľúčovým meraním, môžu existovať aj ďalšie príklady, keď PC_x poskytne užitočné informácie.

▼M8

Tabuľka 2

Porovnanie výsledkov skúšok STTA a VM7Luc ER TA v prípade látok testovaných v obidvoch skúškach antagonistov a klasifikovaných ako antagonisty estrogénových receptorov (POS) alebo ako negatívne (NEG)

	Látka ([a])	Registračné číslo CAS	Skúška ER STTA ([1])		Skúška VM7Luc ER TA ([2])		Potenciálne účinky ER STTA ([4])	Klasifikácia na základe konsenzu podľa výboru ICCVAM ([5])	Chemická trieda podľa MeSH ([6])	Trieda výrobku ([7])
			Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota IC_{50} ([b]) (M)	Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
1	4-hydroxytamoxifén	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	mierne POS	POS	uhľovodík (cyklický)	liek
2	dibenz[a,h]antracén	53-70-3	POS	Bez hodnoty IC_{50}	POS	Bez hodnoty IC_{50}	POS	PP	polycyklická zlúčenina	laboratórna chemikália, prírodný produkt
3	mifepristón	84371-65-3	POS	$5{,}61 \times 10^{-6}$	NEG	—	slabo POS	NEG	steroid	liek
4	raloxifén HC1	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	mierne POS	POS	uhľovodík (cyklický)	liek
5	tamoxifén	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	POS	POS	uhľovodík (cyklický)	liek
6	17β-estradiol	50-28-2	NEG	—	NEG	—	PN	PN	steroid	liek, veterinárne činidlo

▼M8

	Látka ([a])	Registračné číslo CAS	Skúška ER STTA ([1])		Skúška VM7Luc ER TA ([2])		Potenciálne účinky ER STTA ([4])	Klasifikácia na základe konsenzu podľa výboru ICCVAM ([5])	Chemická trieda podľa MeSH ([6])	Trieda výrobku ([7])
			Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota IC_{50} ([b]) (M)	Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
7	apigenín	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	heterocyklická zlúčenina	farbivo, prírodný produkt, farmaceutický medziprodukt
8	atrazín	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	heterocyklická zlúčenina	herbicíd
9	di-n-butyl ftalát	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	ester, kyselina ftalová	kozmetická zložka, priemyselná chemikália, zmäkčovadlo
10	fenarimol	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	netestované	PN	heterocyklická zlúčenina, pyrimidín	fungicíd
11	flavón	525-82-6	NEG	—	NEG	—	PN	PN	flavonoid, heterocyklická zlúčenina	prírodný produkt, liek
12	flutamid	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	amid	liek, veterinárne činidlo
13	genisteín	446-72-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	flavonoid, heterocyklická zlúčenina	prírodný produkt, liek

▼M8

	Látka ([a])	Registračné číslo CAS	Skúška ER STTA ([1])		Skúška VM7Luc ER TA ([2])		Potenciálne účinky ER STTA ([4])	Klasifikácia na základe konsenzu podľa výboru ICCVAM ([5])	Chemická trieda podľa MeSH ([6])	Trieda výrobku ([7])
			Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota IC_{50} ([b]) (M)	Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	Hodnota IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
14	p-n-nonylfenol	104-40-5	NEG	—	NEG	—	netestované	NEG	fenol	chemický medzi-produkt
15	resveratrol	501-36-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	uhľovodík (cyklický)	prírodný produkt

Skratky: Registračné číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service); M = molárna; IC_{50} = polovičná maximálna inhibičná koncentrácia testovanej látky; NEG = negatívna, PN = predpokladaná negatívna; POS = pozitívna; PP = predpokladaná pozitívna.

([a]) Bežné látky testované v skúškach STTA a VM7Luc ER TA, ktoré boli označené ako antagonisty estrogénových receptorov alebo ako negatívne a ktoré boli použité na vyhodnotenie presnosti vo validačnej štúdii VM7Luc ER TA (2) (3).

([b]) Maximálna koncentrácia testovaná za neprítomnosti obmedzení v dôsledku cytotoxicity alebo nerozpustnosti bola 1×10^{-3} M (skúška STTA) a 1×10^{-5} M (skúška VM7Luc ER TA).

([1]) Správa o validácii skúšky stabilne transfektovanej transkripčnej aktivácie na stanovenie pôsobenia, ktoré sprostredkúvajú estrogénové receptory, časť B (2).

([2]) Hodnotiaca správa výboru ICCVAM o testovacej metóde LUMI-CELL CELL® ER (VM7Luc ER TA): Metóda *in vitro* na určenie agonistov a antagonistov ER [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]) Stredné hodnoty IC_{50} sa vypočítali na základe hodnôt, ktoré uviedli laboratóriá validačnej štúdie VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, a Hiyoshi) (3).

([4]) To, či dané látky spôsobujú ER STTA, sa predpokladá na základe ich nahlásených účinkov, ktoré sú známe z historických údajov CERI pochádzajúcich zo skúšky viazania na estrogénové receptory, z uterotrofickej skúšky a z informácií z verejne dostupnej literatúry (2).

([5]) Klasifikácia látky ako antagonistu estrogénových receptorov alebo ako látky, ktorá je negatívna, vychádzala z informácií uvedených v podkladových kontrolných dokumentoch (Background Review Document – BRD) výboru ICCVAM pre skúšky viazania na estrogénové receptory a skúšky transaktivácie (TA) (31), ako aj z informácií získaných z publikácií publikovaných a revidovaných po dokončení podkladových kontrolných dokumentov výboru ICCVAM (2) (3) (18) (31).

([6]) Látky boli zaradené do jednej alebo viacerých chemických tried podľa systému Medical Subject Headings (MeSH) inštitútu U. S. National Library of Medicine, čo je medzinárodne uznávaný klasifikačný systém (k dispozícii na adrese http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Látky boli zaradené do jednej alebo viacerých tried výrobku podľa databázy nebezpečných látok inštitútu U.S. National Library of Medicine (k dispozícii na adrese http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER

Základné zložky skúšky

11. Táto testovacia metóda sa vzťahuje na skúšky, v ktorých sa používa stabilne transfektovaný alebo endogénny receptor ERα a stabilne transfektovaný konštrukt reportérového génu riadený jedným alebo viacerými úsekmi estrogénovej reakcie. Môžu však byť prítomné aj iné receptory, napríklad ERβ. Toto sú základné zložky skúšky.

Kontroly

12. Je potrebné opísať základ navrhovaných súbežných referenčných štandardov pre každú skúšku agonistov a antagonistov. Súbežné kontroly (negatívne kontroly, kontroly s rozpúšťadlom a pozitívne kontroly) podľa potreby slúžia ako ukazovateľ toho, že skúška je funkčná v podmienkach testovania, a poskytujú základ pre porovnania medzi jednotlivými pokusmi. Obvykle sú súčasťou kritérií prijateľnosti pre daný pokus (1).

Štandardné postupy kontroly kvality

13. Štandardné postupy kontroly kvality sa majú vykonať podľa príslušných pokynov pre každú skúšku, aby sa zabezpečilo, že bunková línia zostane počas viacerých pasáží stabilná, bez prítomnosti mykoplazmy (t. j. bez bakteriálnej kontaminácie) a schopná poskytovať v priebehu času očakávané reakcie sprostredkované estrogénovými receptormi. Ďalej je potrebné skontrolovať bunkové línie z hľadiska ich správnej identity a prítomnosti iných kontaminantov (napr. húb, kvasiniek a vírusov).

Overovanie spôsobilosti laboratória

14. Pred testovaním neznámych chemikálií pomocou ktorejkoľvek skúšky v rámci tejto testovacej metódy by každé laboratórium malo preukázať spôsobilosť na používanie skúšky. Na preukázanie spôsobilosti každé laboratórium otestuje 14 látok na preukázanie spôsobilosti, ktoré sú uvedené v tabuľke 3 v prípade skúšky agonistov, a 10 látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v tabuľke 4 v prípade skúšky antagonistov. Týmto testovaním spôsobilosti sa potvrdí aj vnímavosť testovacieho systému. Zoznam látok na preukázanie spôsobilosti je podsúborom referenčných látok uvedených v normách výkonnosti pre skúšky ER TA (6). Tieto látky sú komerčne dostupné, predstavujú triedy chemikálií bežne spojené s agonistickým alebo antagonistickým pôsobením na estrogénové receptory, majú vhodný rozsah potencie očakávanej pri agonistoch/antagonistoch estrogénových receptorov (t. j. od silnej po slabú potenciu) a sú medzi nimi aj negatívne látky. Testovanie látok na preukázanie spôsobilosti by sa malo opakovať najmenej dvakrát, v rôznych dňoch. Spôsobilosť sa preukazuje správnou klasifikáciou (pozitívna/negatívna) každej látky na preukázanie spôsobilosti. Testovanie spôsobilosti by mal zopakovať každý laboratórny technik pri učení sa skúšok. V závislosti od typu buniek sa niektoré z týchto látok na preukázanie spôsobilosti môžu správať ako selektívne modulátory estrogénových receptorov (SERM) a vykazovať agonistické aj antagonistické pôsobenie. Látky na preukázanie spôsobilosti sú však v tabuľkách 3 a 4 klasifikované podľa svojho známeho prevažujúceho pôsobenia a to by sa malo použiť na hodnotenie spôsobilosti.

15. Na preukázanie výkonnosti a na účely kontroly kvality by každé laboratórium malo zostaviť historické databázy agonistov a antagonistov s referenčným štandardom (napr. 17β-estradiol a tamoxifén), údaje o pozitívnych a negatívnych kontrolných chemikáliách a kontrole s aplikáciou rozpúšťadla (napr. DMSO). Na začiatok sa databáza vytvorí zo sérií najmenej 10 nezávislých agonistov (napr. 17β-estradiol) a 10 nezávislých antagonistov (napr. tamoxifén). Databáza sa následne rozšíri o výsledky z budúcich analýz týchto referenčných štandardov a kontrol s aplikáciou rozpúšťadla, aby sa zabezpečila konzistentnosť a výkonnosť biologickej skúšky vykonávanej laboratóriom v priebehu času.

▼M8

Tabuľka 3

Zoznam (14) látok na preukázanie spôsobilosti v prípade skúšky agonistov (1)

Č. (8)	Látka	Registračné číslo CAS	Očakávaná reakcia (2)	Skúška STTA			Skúška VM7Luc ER TA		Chemická trieda podľa MeSH (6)	Trieda výrobku (7)
				Hodnota PC_{10} (M) (3)	Hodnota PC_{50} (M) (3)	Rozsah test. koncentrácií (M)	Hodnota EC_{50} VM7Luc (M) (4)	Najvyššia konc. pre test na zistenie rozsahu (M) (5)		
14	dietylstilbestrol	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} – 10^{-8}$	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	uhľovodík (cyklický)	liek, veterinárne činidlo
12	17α-estradiol	57-91-0	POS	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	steroid	liek, veterinárne činidlo
15	*mezo*-hexestrol	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	uhľovodík (cyklický), fenol	liek, veterinárne činidlo
11	4-*terc*-oktylfenol	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	fenol	chemický medziprodukt
9	genisteín	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	flavonoid, heterocyklická zlúčenina	prírodný produkt, liek
6	Bisfenol A	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	fenol	chemický medziprodukt

▼M8

Č. ([8])	Látka	Registračné číslo CAS	Očakávaná reakcia ([2])	Skúška STTA			Skúška VM7Luc ER TA		Chemická trieda podľa MeSH ([6])	Trieda výrobku ([7])
				Hodnota PC_{10} (M) ([3])	Hodnota PC_{50} (M) ([3])	Rozsah test. koncentrácií (M)	Hodnota EC_{50} VM7Luc (M) ([4])	Najvyššia konc. pre test na zistenie rozsahu (M) ([5])		
2	kaempferol	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	flavonoid, heterocyklická zlúčenina	prírodný produkt
3	Butylbenzyl ftalát	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	karboxylová kyselina, ester, kyselina ftalová	zmäkčovadlo, priemyselná chemikália
4	*p,p'*- metoxychlór	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	uhľovodík (halogénovaný)	pesticíd, veterinárne činidlo
1	etylparabén	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	karboxylová kyselina, fenol	liek, konzervačný prostriedok
17	atrazín	1912-24-9	NEG	—	—	$10^{-10} – 10^{-4}$	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	heterocyklická zlúčenina	herbicíd
20	spironolaktón	52-01-7	NEG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	laktón, steroid	liek
21	ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	heterocyklická zlúčenina	liek

▼M8

Č. ([8])	Látka	Registračné číslo CAS	Očakávaná reakcia ([2])	Skúška STTA			Skúška VM7Luc ER TA		Chemická trieda podľa MeSH ([6])	Trieda výrobku ([7])
				Hodnota PC_{10} (M) ([3])	Hodnota PC_{50} (M) ([3])	Rozsah test. koncentrácií (M)	Hodnota EC_{50} VM7Luc (M) ([4])	Najvyššia konc. pre test na zistenie rozsahu (M) ([5])		
22	reserpín	50-55-5	NEG	—	—	10^{-11} – 10^{-5}	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	heterocyklická zlúčenina, indol	liek, veterinárne činidlo

Skratky: Registračné číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service); EC_{50} = polovičná maximálna účinná koncentrácia testovanej látky; NEG = negatívna; POS = pozitívna; PC_{10} (a PC_{50}) = koncentrácia testovanej látky, pri ktorej reakcia predstavuje 10 % (alebo 50 % v prípade PC_{50}) reakcie vyvolanej pozitívnou kontrolou (E2, 1 nm) na každej mikrotitračnej platničke.

([1]) Klasifikácia látky ako pozitívnej alebo negatívnej, pokiaľ ide o jej agonistické pôsobenie na estrogénové receptory, vychádzala z podkladových kontrolných dokumentov (Background Review Document – BRD) výboru ICCVAM pre skúšky viazania na estrogénové receptory a skúšky transaktivácie (TA) (31), ako aj z empirických údajov a ďalších informácií získaných z referenčných štúdií publikovaných a revidovaných po dokončení podkladových kontrolných dokumentov výboru ICCVAM (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

([2]) Hodnoty uvedené v návrhu správy o predbežnej validácii a medzilaboratórnej validácii skúšky stabilne transfektovanej transkripčnej aktivácie (TA) na stanovenie estrogénového pôsobenia – skúška reportérového génu, ktorého mediátorom je ľudský ERα, s použitím bunkovej línie hER-HeLa-9903 [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]) Stredné hodnoty EC_{50} sa vypočítali na základe hodnôt, ktoré uviedli laboratóriá validačnej štúdie VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, a Hiyoshi) (3).

([4]) Nahlásené koncentrácie boli najvyššie testované koncentrácie (test na zistenie rozsahu) počas validácie skúšky VM7Luc ER TA. Ak sa koncentrácie medzi laboratóriami líšili, nahlásená bola najvyššia koncentrácia. Pozri tabuľku 4-10 v Hodnotiacej správe výboru ICCVAM o testovacej metóde LUMI-Cell® ER (VM7Luc ER TA): Skúška *in vitro* na identifikáciu agonistického a antagonistického pôsobenia chemikálií na estrogénové receptory ľudí [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]) Látky boli zaradené do jednej alebo viacerých chemických tried podľa systému Medical Subject Headings (MeSH) inštitútu U. S. National Library of Medicine, čo je medzinárodne uznávaný klasifikačný systém (k dispozícii na adrese: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) Látky boli zaradené do jednej alebo viacerých tried výrobku podľa databázy nebezpečných látok inštitútu U.S. National Library of Medicine (k dispozícii na adrese: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

([7]) Podľa tabuľky 1 noriem výkonnosti [Zoznam referenčných chemikálií (22) na hodnotenie presnosti agonistov estrogénových receptorov] (6).

([8]) Ak látka na preukázanie spôsobilosti už nie je komerčne dostupná, možno použiť látku s rovnakou klasifikáciou a porovnateľnou potenciou, spôsobom účinku a chemickou triedou.

▼M8

Tabuľka 4

Zoznam (10) látok na preukázanie spôsobilosti v prípade skúšky antagonistov

	Látka ([a])	Registračné číslo CAS	Skúška ER STTA ([1])			Skúška VM7Luc ER TA ([2])			Potenciálne účinky ER STTA ([1])	Klasifikácia na základe konsenzu podľa výboru ICCVAM ([5])	Chemická trieda podľa MeSH ([6])	Trieda výrobku ([7])
			Transaktivačné(TA) pôsobenie na ER	IC_{50} (M)	Rozsah test. konc. (M)	Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	IC_{50} ([4]) (M)	Najvyššia konc. pre test na zistenie rozsahu (M) ([5])				
1	4-hydroxytamoxifén	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	mierne POS	POS	uhľovodík (cyklický)	liek
2	raloxifén HC1	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	mierne POS	POS	uhľovodík (cyklický)	liek
3	tamoxifén	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} – 10^{-5}$	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	POS	POS	uhľovodík (cyklický)	liek
4	17β-estradiol	50-28-2	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	má byť negatívna (*)	PN	steroid	liek, veterinárne činidlo
5	apigenín	520-36-5	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	heterocyklická zlúčenina	farbivo, prírodný produkt, farmaceutický medziprodukt
6	di-n-butyl ftalát	84-74-2	NEG	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	ester, kyselina ftalová	kozmetická zložka, priemyselná chemikália, zmäkčovadlo

▼M8

	Látka ([a])	Registračné číslo CAS	Skúška ER STTA ([1])			Skúška VM7Luc ER TA ([2])			Potenciálne účinky ER STTA ([1])	Klasifikácia na základe konsenzu podľa výboru ICCVAM ([5])	Chemická trieda podľa MeSH ([6])	Trieda výrobku ([7])
			Transaktivačné(TA) pôsobenie na ER	IC_{50} (M)	Rozsah test. konc. (M)	Transaktivačné (TA) pôsobenie na ER	IC_{50} ([4]) (M)	Najvyššia konc. pre test na zistenie rozsahu (M) ([5])				
7	flavón	525-82-6	NEG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	má byť negatívna (*)	PN	flavonoid, heterocyklická zlúčenina	prírodný produkt, liek
8	genisteín	446-72-0	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	má byť negatívna (*)	NEG	flavonoid, heterocyklická zlúčenina	prírodný produkt, liek
9	p-n-nonylfenol	104-40-5	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	netestované	NEG	fenol	chemický medziprodukt
10	resveratrol	501-36-0	NEG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	má byť negatívna (*)	NEG	uhľovodík (cyklický)	prírodný produkt

Skratky: Registračné číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service); M = molárna; IC_{50} = polovičná maximálna inhibičná koncentrácia testovanej látky; NEG = negatívna, PN = predpokladaná negatívna; POS = pozitívna.

(*) klasifikovaná ako negatívna podľa preskúmania literatúry (2).

([a]) Bežné látky testované v skúškach STTA a VM7Luc ER TA, ktoré boli označené ako antagonisty estrogénových receptorov alebo ako negatívne a ktoré boli použité na vyhodnotenie presnosti vo validačnej štúdii VM7Luc ER TA (2) (3).

([1]) Správa o validácii skúšky stabilne transfektovanej transkripčnej aktivácie na stanovenie pôsobenia, ktoré sprostredkúvajú estrogénové receptory, časť B (2).

([2]) Hodnotiaca správa výboru ICCVAM o testovacej metóde LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): Metóda *in vitro* na určenie agonistov a antagonistov ER [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]) Stredné hodnoty IC_{50} sa vypočítali na základe hodnôt, ktoré uviedli laboratóriá validačnej štúdie VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, a Hiyoshi) (3).

([4]) Nahlásené koncentrácie boli najvyššie testované koncentrácie (test na zistenie rozsahu) počas validácie skúšky VM7Luc ER TA. Ak sa koncentrácie medzi laboratóriami líšili, nahlásená bola najvyššia koncentrácia. Pozri tabuľku 4-11 v Hodnotiacej správe výboru ICCVAM o testovacej metóde LUMI-Cell® ER (VM7Luc ER TA): Skúška *in vitro* na identifikáciu agonistického a antagonistického pôsobenia chemikálií na estrogénové receptory ľudí [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]) Klasifikácia látky ako antagonistu estrogénových receptorov alebo ako látky, ktorá je negatívna, vychádzala z informácií uvedených v podkladových kontrolných dokumentoch (Background Review Document – BRD) výboru ICCVAM pre testovacie metódy viazania na estrogénové receptory a testovacie metódy transaktivácie (TA) (31), ako aj z informácií získaných z publikácií publikovaných a revidovaných po dokončení podkladových kontrolných dokumentov výboru ICCVAM (2) (3) (18) (31).

([6]) Látky boli zaradené do jednej alebo viacerých chemických tried podľa systému Medical Subject Headings (MeSH) inštitútu U. S. National Library of Medicine, čo je medzinárodne uznávaný klasifikačný systém (k dispozícii na adrese http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Látky boli zaradené do jednej alebo viacerých tried výrobku podľa databázy nebezpečných látok inštitútu U.S. National Library of Medicine (k dispozícii na adrese http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

Kritériá prijateľnosti testovacích cyklov

16. Prijatie alebo zamietnutie testovacieho cyklu je založené na hodnotení výsledkov získaných pri referenčných štandardoch a kontrolách použitých pri jednotlivých pokusoch. Hodnoty PC_{50} (EC_{50}) alebo IC_{50} v prípade referenčných štandardov by mali spĺňať kritériá prijateľnosti, ako sa stanovuje pre vybranú skúšku (v prípade STTA pozri dodatok 2, v prípade VM7Luc ER TA pozri dodatok 3), a všetky pozitívne/negatívne kontroly by mali byť správne klasifikované pre každý prijatý pokus. Schopnosť dôkladne vykonať skúšku by sa mala preukázať vytvorením a udržiavaním historickej databázy referenčných štandardov a kontrol (pozri odsek 15). Na meranie vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti možno použiť štandardné odchýlky (SD) alebo variačné koeficienty (CV) pre stredné hodnoty parametrov na zostrojenie krivky referenčných noriem z viacerých pokusov. Okrem toho by mali byť splnené tieto zásady týkajúce sa kritérií prijateľnosti:

— Údaje by mali byť dostatočné na kvantitatívne hodnotenie aktivácie (v prípade skúšky agonistov) alebo potlačenia estrogénových receptorov (v prípade skúšky antagonistov) (t. j. účinnosti a potencie).

— Stredná hodnota aktivity reportérových génov musí byť pri referenčnej koncentrácii referenčného estrogénu najmenej minimálna hodnota určená v skúškach týkajúcich sa hodnoty pri kontrole s nosičom (rozpúšťadlom), aby sa zabezpečila primeraná citlivosť. Pokiaľ ide o skúšky STTA a VM7Luc ER TA, je to štvornásobok strednej hodnoty v kontrole s nosičom na každej mikrotitračnej platničke.

— Testované koncentrácie musia zostať v rozpätí rozpustnosti testovaných chemikálií a nesmú vykazovať cytotoxicitu.

Analýza údajov

17. Na klasifikáciu pozitívnej a negatívnej reakcie sa použije postup interpretácie údajov stanovený pre každú skúšku.

18. Splnenie kritérií prijateľnosti (odsek 16) naznačuje, že skúška funguje správne, nie je však zabezpečené, že z ktoréhokoľvek konkrétneho testovacieho cyklu vyplynú presné údaje. Zopakovanie výsledkov prvého cyklu je najlepší ukazovateľ toho, že boli generované presné údaje. Ak dva cykly poskytnú reprodukovateľné výsledky (napr. z oboch testovacích cyklov vyplýva, že testovaná chemikália je pozitívna), nie je potrebné vykonať tretí cyklus.

19. Ak dva cykly neprinesú reprodukovateľné výsledky (napr. testovaná chemikália je pozitívna pri jednom cykle a negatívna pri druhom cykle) alebo ak sa vyžaduje vyššia miera istoty, pokiaľ ide o výsledok tejto skúšky, mali by sa vykonať aspoň tri nezávislé cykly. V tomto prípade je klasifikácia založená na dvoch zhodných výsledkoch z troch.

Všeobecné kritériá interpretácie údajov

20. V súčasnosti neexistuje všeobecne dohodnutá metóda na interpretáciu údajov o transaktivácii estrogénových receptorov (ER TA). Oba typy posudzovania pôsobenia, ktoré sprostredkúvajú estrogénové receptory, t. j. kvalitatívne hodnotenie (napr. či sú výsledky pozitívne/negatívne) aj kvantitatívne hodnotenie (napr. určenie hodnôt EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}), by však mali byť založené na empirických údajoch a spoľahlivom vedeckom úsudku. Ak je to možné, pozitívne výsledky by mali byť charakterizované rozsahom účinku v porovnaní s kontrolou s nosičom (rozpúšťadlom) alebo s referenčným estrogénom a koncentráciou, pri ktorej účinok nastáva (napr. hodnoty EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max}, IC_{50} atď.).

▼M8

Správa o teste

21. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Skúška:

— použitá skúška,

— kontrola/referenčný štandard/testovaná chemikália,

— zdroj, číslo šarže, konečný dátum použitia, ak sú tieto informácie k dispozícii,

— stabilita testovanej chemikálie, ak je známa,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle, ak je známa,

— prípadné meranie pH, osmolality a zrazeniny v kultivačnom médiu, do ktorého bola pridaná testovaná chemikália.

Jednozložkové látky:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Rozpúšťadlo/nosič:

— opis (povaha, dodávateľ a šarža),

— zdôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Bunky:

— typ a zdroj buniek:

  • je prítomná endogénna expresia estrogénového receptora? Ak nie, ktorý receptor, resp. ktoré receptory boli transfektované?

  • použitý reportérový génový konštrukt, resp. konštrukty (vrátane zdrojových druhov),

  • metóda transfekcie,

  • metóda výberu na udržiavanie stabilnej transfekcie (ak sa uplatňuje),

  • je metóda transfekcie relevantná pre stabilné línie?

— počet pasáží (od rozmrazenia),

▼**M8**

— počet pasáží buniek pri rozmrazovaní,

— metódy udržiavania bunkových kultúr.

Podmienky testovania:

— obmedzenia spojené s rozpustnosťou,

— opis použitých metód hodnotenia životaschopnosti,

— skladba média, koncentrácia CO_2,

— koncentrácie testovanej chemikálie,

— objem nosiča a pridanej testovanej chemikálie,

— teplota a vlhkosť pri inkubácii,

— trvanie aplikovania,

— hustota buniek na začiatku a počas aplikovania,

— pozitívne a negatívne referenčné štandardy,

— reportérové reagenty (názov výrobku, dodávateľ a šarža),

— kritériá na hodnotenie testovacích cyklov ako cyklov poskytujúcich pozitívne, negatívne alebo nejednoznačné výsledky.

Kontrola prijateľnosti:

— násobné indukcie pre každú mikrotitračnú platničku v rámci skúšky a informácie, či spĺňajú minimum, ktoré sa požaduje v danej skúške na základe historických kontrol,

— skutočné hodnoty pre kritériá prijateľnosti, napr. $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ a hodnoty sklonu krivky podľa Hillovej rovnice (Hillslope), pre súbežné pozitívne kontroly/referenčné štandardy.

Výsledky:

— nespracované a normalizované údaje,

— úroveň maximálnej násobnej indukcie,

— údaje o cytotoxicite,

— najnižšia účinná koncentrácia (LEC), ak existuje,

— hodnoty RPC_{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} a/alebo EC_{50}, podľa potreby,

— ak je to možné, závislosť medzi koncentráciou a reakciou,

▼M8

— štatistické analýzy, ak existujú, spolu s meraním chyby a spoľahlivosti (napr. SEM, SD, CV alebo 95 % CI) a opis spôsobu získania týchto hodnôt.

Rozbor výsledkov

Záver

LITERATÚRA

(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 Vitro 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): s. 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): s. 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: s. 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): s. 1073-89.

(11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): s. 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): s. 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): s. 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): s. 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): s. 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): s. 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): s. 379-383.

(21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): s. 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): s. 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): s. 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): s. 105-12.

(25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): s. 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): s. 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): s. 1460-1468.

▼**M8**

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): s. 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: s. 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):s. 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

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV A SKRATKY

Kritériá prijateľnosti: minimálne normy výkonnosti kontrol a referenčných štandardov v rámci pokusu. Všetky kritériá prijateľnosti majú byť splnené, aby sa pokus považoval za platný.

Presnosť (zhoda): miera zhody výsledkov skúšky s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o mieru výkonnosti skúšky a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom zhoda a označuje podiel správnych výsledkov skúšky (1).

Agonista: látka, ktorá vyvoláva reakciu, napr. transkripciu, keď sa viaže na konkrétny receptor.

Antagonista: druh receptorového ligandu alebo chemikálie, ktorý sám osebe nevyvoláva biologickú reakciu po naviazaní na receptor, ale blokuje alebo tlmí reakcie sprostredkované agonistom.

Antiestrogénové pôsobenie: schopnosť chemikálie potlačiť účinok 17ß-estradiolu sprostredkovaný estrogénovými receptormi.

Morfológia bunky: tvar a vzhľad buniek, ktoré rastú v monovrstve v jednej jamke platne s tkanivovou kultúrou. Umierajúce bunky majú často abnormálnu morfológiu.

CF: koncepčný rámec OECD na testovanie a hodnotenie endokrinných disruptorov.

Ošetrenie uhlím/dextránom: ošetrenie séra použitého v bunkovej kultúre. Ošetrením uhlím/dextránom (často označované ako „stripping“) sa odstraňujú endogénne hormóny a proteíny viažuce hormóny.

Chemikália: látka alebo zmes.

Cytotoxicita: škodlivé účinky na štruktúru alebo funkciu bunky, ktoré môžu v konečnom dôsledku spôsobiť smrť buniek a môžu sa prejavovať znížením počtu buniek prítomných v jamke na konci času expozície alebo znížením schopnosti merať danú funkciu bunky v porovnaní so súbežnou kontrolou s nosičom.

CV: variačný koeficient.

DCC-FBS: bovinné fetálne sérum ošetrené uhlím povrchovo upraveným dextránom.

DMEM: Dulbeccova modifikácia Eaglovho kultivačného média.

DMSO: dimetylsulfoxid.

E2: 17β-estradiol.

EC_{50}: polovičná maximálna účinná koncentrácia testovanej chemikálie.

ED: narušenie endokrinného systému.

hERα: ľudský estrogénový receptor alfa.

▼M8

hERß: ľudský estrogénový receptor beta.

EFM: kultivačné médium bez estrogénov. Dulbeccova modifikácia Eaglovho kultivačného média (DMEM) doplnená o 4,5 % FBS ošetrené uhlím povrchovo upraveným dextránom, 1,9 % L-glutamín a 0,9 % Pen-Strep.

ER: estrogénový receptor.

ERE: úsek estrogénovej reakcie.

Estrogénové pôsobenie: schopnosť chemikálie napodobniť 17β-estradiol v jeho schopnosti viazať a aktivovať estrogénové receptory. Touto testovacou metódou možno určiť estrogénové pôsobenie sprostredkované receptorom hERα.

ERTA: transaktivácia estrogénových receptorov.

FBS: bovinné fetálne sérum.

HeLa: nesmrteľná bunková línia ľudských buniek z krčka maternice.

HeLa9903: bunkový subklon HeLa, do ktorého bol stabilne transfektovaný receptor hERα a reportérový gén luciferázy.

IC_{50}: polovičná maximálna účinná koncentrácia inhibičnej testovanej chemikálie.

ICCVAM: Medziagentúrny koordinačný výbor pre validáciu alternatívnych metód (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods).

Medzilaboratórna reprodukovateľnosť: miera, do akej rôzne kvalifikované laboratóriá, ktoré používajú rovnaký protokol a testujú rovnaké látky, dokážu dosiahnuť kvalitatívne a kvantitatívne podobné výsledky. Medzilaboratórna reprodukovateľnosť sa určuje počas postupov predbežnej validácie a validácie a udáva sa ňou rozsah, v akom možno skúšku úspešne preniesť medzi laboratóriami. Označuje sa aj ako reprodukovateľnosť medzi laboratóriami (1).

Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť: určenie miery, do akej kvalifikovaní pracovníci v rámci jedného laboratória dokážu úspešne opakovať výsledky s použitím konkrétneho protokolu v rôznom čase. Takisto je známa ako reprodukovateľnosť v rámci laboratória (1).

LEC: najnižšia účinná koncentrácia – je to najnižšia koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá vyvoláva reakciu (t. j. najnižšia koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej je násobná indukcia štatisticky odlišná od súbežnej kontroly s nosičom).

Test Me-too: hovorový názov skúšky, ktorá je štrukturálne a funkčne podobná validovanej a akceptovanej referenčnej testovacej metóde. Môže sa používať namiesto výrazu podobná testovacia metóda.

MT: metalotioneín.

MMTV: vírus nádoru mliečnych žliaz myší.

OHT: 4-hydroxytamoxifén.

PBTG: usmernenie na vykonávanie testov výkonnosti.

▼M8

PC (pozitívna kontrola): silne účinná látka, najlepšie 17ß-estradiol, ktorá je zahrnutá vo všetkých testoch na zaistenie správneho fungovania skúšky.

PC_{10}: koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej merané pôsobenie v skúške agonistov predstavuje 10 % maximálneho pôsobenia vyvolaného pozitívnou kontrolou (E2 pri koncentrácii 1 nM pri skúške STTA) na každej mikrotitračnej platničke.

PC_{50}: koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej merané pôsobenie v skúške agonistov je 50 % maximálneho pôsobenia vyvolaného pozitívnou kontrolou (E2 pri referenčnej koncentrácii špecifikovanej v testovacej metóde) na každej mikrotitračnej platničke.

PC_{Max}: koncentrácia testovanej chemikálie vyvolávajúca RPC_{Max}.

Normy výkonnosti: normy založené na validovanej skúške, ktoré slúžia ako základ na hodnotenie porovnateľnosti navrhovanej skúšky, ktorá je mechanicky a funkčne podobná. Patria sem: 1. nevyhnutné zložky skúšky; 2. minimálny zoznam referenčných chemikálií vybraných spomedzi látok používaných na preukázanie prijateľnej výkonnosti validovanej testovacej metódy a 3. porovnateľné úrovne presnosti a spoľahlivosti založené na tom, čo sa získalo pri validovanej testovacej metóde, ktoré by navrhovaná skúška mala preukázať pri hodnotení pomocou minimálneho zoznamu referenčných chemikálií (1).

Látky na preukázanie spôsobilosti: podskupina referenčných látok zahrnutých do noriem výkonnosti, ktorú môžu laboratóriá použiť na preukázanie technickej spôsobilosti na vykonávanie štandardizovanej testovacej metódy. Kritériá výberu pre tieto látky zvyčajne zahŕňajú podmienku, že látky predstavujú daný rozsah reakcií, sú komerčne dostupné a sú o nich k dispozícii referenčné údaje vysokej kvality.

Spôsobilosť: preukázaná schopnosť správne vykonať skúšku pred testovaním neznámych látok.

Referenčný estrogén (pozitívna kontrola, PC): 17β-estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referenčný štandard: referenčná látka použitá na preukázanie primeranosti skúšky. 17β-estradiol je referenčným štandardom pre skúšky STTA a VM7Luc ER TA.

Referenčné testovacie metódy: skúšky, o ktoré sa PBTG 455 opiera.

Relevantnosť: opis vzťahu skúšky k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej sa skúškou správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) skúšky (1).

Spoľahlivosť: miera rozsahu, v rámci ktorého sa môže skúška počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti.

RLU: relatívne svetelné jednotky.

RNA: kyselina ribonukleová.

RPC_{Max}: maximálna úroveň reakcie vyvolanej testovanou chemikáliou, vyjadrená ako percentuálny podiel reakcie vyvolanej pri koncentrácii 1 nM E2 na rovnakej mikrotitračnej platničke.

▼M8

RPMI: kultivačné médium RPMI 1 640 doplnené o 0,9 % Pen-Strep a 8,0 % bovinné fetálne sérum (FBS).

Testovací cyklus: individuálny pokus, pri ktorom sa vyhodnocuje chemické pôsobenie na biologický výsledok skúšky. Každý testovací cyklus je kompletný pokus vykonaný na replikovaných jamkách s bunkami naočkovanými zo spoločného zdroja buniek v rovnakom čase.

Nezávislý testovací cyklus: samostatný, nezávislý pokus na vyhodnotenie chemického pôsobenia na biologický výsledok skúšky, v ktorom sa použijú bunky z iného zdroja, čerstvo zriedené chemikálie a ktorý sa vykoná v rôznych dňoch, prípadne v rovnaký deň, ale vykonajú ho iní pracovníci.

SD: štandardná odchýlka.

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/účinných látok správne klasifikovaných skúškou. Je to miera presnosti skúšky, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky a zároveň dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti skúšky (1).

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neúčinných látok správne klasifikovaných testom. Je to miera presnosti skúšky, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky a zároveň dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti skúšky (1).

Stabilná transfekcia: prenos DNA do kultivovaných buniek takým spôsobom, že sa stabilne začlení do genómu buniek, čo vedie k stabilnej expresii transfektovaných génov. Na výber klonov stabilne transfektovaných buniek slúžia stabilné markery (napr. rezistencia voči G418).

Skúška STTA: skúška stabilne transfektovanej transaktivácie, skúška transkripčnej aktivácie ERα pomocou bunkovej línie HeLa 9 903.

Štúdia: úplný rozsah experimentálnej práce uskutočnenej s cieľom vyhodnotiť jednu špecifickú látku pomocou špecifickej skúšky. Súčasťou štúdie sú všetky kroky vrátane testov riedenia testovanej látky v testovacích médiách, predbežných testovacích cyklov na zistenie rozsahu, všetkých potrebných komplexných testovacích cyklov, analýz údajov, zabezpečenia kvality, posúdení cytotoxicity atď. Uskutočnenie štúdie umožňuje klasifikovať pôsobenie testovanej chemikálie na cieľ toxicity (t. j. výsledky poukazujúce na účinnú látku, neúčinnú látku alebo nejednoznačné výsledky), ktoré sa hodnotí prostredníctvom použitej skúšky, a umožňuje vyvodiť odhad potencie vzhľadom na pozitívnu referenčnú chemikáliu.

Látka: v zmysle nariadenia REACH ([1]) sa látka vymedzuje ako chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie ich stability a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ktorá však nezahŕňa žiadne rozpúšťadlá, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo zmeny jej zloženia. Veľmi podobné vymedzenie pojmu sa používa v kontexte GHS OSN (1).

TA (transaktivácia): iniciácia syntézy mRNA v reakcii na špecifický chemický signál, napríklad naviazanie estrogénu na estrogénový receptor.

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 z 18. decembra 2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemikálií (REACH) a o zriadení Európskej chemickej agentúry, o zmene a doplnení smernice 1999/45/ES a o zrušení nariadenia Rady (EHS) č. 793/93 a nariadenia Komisie (ES) č. 1488/94, smernice Rady 76/769/EHS a smerníc Komisie 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES (Ú. v. EÚ L 304, 22.11.2007, s. 1).

▼M8

Skúška: v kontexte tejto testovacej metódy je skúška jednou z metodík, ktoré sa akceptujú ako platné z hľadiska splnenia stanovených kritérií výkonnosti. Medzi zložky skúšky patrí napríklad špecifická bunková línia so súvisiacimi kultivačnými podmienkami, špecifické kultivačné médiá, v ktorých sa test uskutočňuje, podmienky usporiadania mikrotitračných platničiek, usporiadanie a riedenia testovaných chemikálií spolu s inými požadovanými opatreniami na kontrolu kvality a súvisiacimi krokmi na hodnotenie údajov.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Transkripcia: syntéza mRNA.

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

Validovaná testovacia metóda: skúška, v súvislosti s ktorou sa ukončili validačné štúdie na stanovenie relevantnosti (vrátane presnosti) a spoľahlivosti na konkrétny účel. Je dôležité poznamenať, že validovaná testovacia metóda nemusí mať dostatočnú výkonnosť, pokiaľ ide o presnosť a spoľahlivosť, aby bola prijateľná pre navrhovaný účel (1).

Validácia: proces, ktorým sa stanovuje spoľahlivosť a relevantnosť určitého prístupu, metódy, skúšky, postupu alebo posúdenia na vymedzený účel (1).

VC (kontrola s nosičom): rozpúšťadlo, ktoré slúži na rozpustenie testovaných a kontrolných chemikálií, sa testuje len ako nosič bez rozpustenej chemikálie.

VM7: imortalizovaná bunka adenokarcinómu, pri ktorej dochádza k endogénnej expresii estrogénového receptora.

VM7Luc4E2: bunková línia VM7Luc4E2 bola odvodená od imortalizovaných buniek adenokarcinómu odvodených od ľudských buniek, pri ktorých dochádza k endogénnej expresii oboch foriem estrogénového receptora (ERα a ERβ) a ktoré boli stabilne transfektované pomocou plazmidu pGudLuc7.ERE. Tento plazmid obsahuje štyri kópie syntetického oligonukleotidu, ktorý obsahuje úsek estrogénovej reakcie pred oblasťou promótora MMTV (vírusu nádoru mliečnych žliaz myší) a gén luciferázy svetlušky svätojánskej.

Slabá pozitívna kontrola: slabo účinná látka vybratá zo zoznamu referenčných chemikálií, ktorá je zahrnutá vo všetkých testoch na zaistenie správneho fungovania skúšky.

▼**M8**

Dodatok 2

SKÚŠKA NA ZÁKLADE TRANSAKTIVÁCIE STABILNE TRANSFEKTOVANÉHO ĽUDSKÉHO ESTROGÉNOVÉHO RECEPTORA A NA URČENIE ESTROGÉNOVÉHO AGONISTICKÉHO A ANTAGONISTICKÉHO PÔSOBENIA CHEMIKÁLIÍ POMOCOU BUNKOVEJ LÍNIE HERA-HELA-9903

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA (POZRI AJ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Pri tejto skúške transaktivácie (TA) sa využíva bunková línia hERα-HeLa-9 903 na stanovenie estrogénového agonistického pôsobenia sprostredkovaného ľudským estrogénovým receptorom alfa (hERα). Validačná štúdia skúšky stabilne transfektovanej transaktivácie (STTA) uskutočnená japonským inštitútom pre hodnotenie chemikálií a výskum (CERI) pomocou bunkovej línie hERα-HeLa-9 903 na stanovenie estrogénového agonistického a antagonistického pôsobenia sprostredkovaného ľudským estrogénovým receptorom alfa (hERα) preukázala relevantnosť a spoľahlivosť skúšky na zamýšľaný účel (1).

2. Táto skúška je osobitne navrhnutá na detekciu transaktivácie sprostredkovanej receptorom hERα, pričom ako sledovaný parameter sa meria chemiluminiscencia. Pri koncentráciách fytoestrogénu vyšších ako 1 μM sa však uvádzal výskyt luminiscenčných signálov, ktoré neboli sprostredkované receptorom, a to pre nadmernú aktiváciu reportérového génu luciferázy (2) (3). Zatiaľ čo z krivky závislosti odozvy od dávky vyplýva, že ku skutočnej aktivácii systému estrogénových receptorov dochádza pri nižších koncentráciách, v systémoch skúšok stabilne transfektovanej transaktivácie estrogénových receptorov (dodatok 1) je potrebné dôkladne preskúmať expresiu luciferázy dosahovanú pri vysokých koncentráciách fytoestrogénov alebo podobných zlúčenín, pri ktorých existuje podozrenie na vyvolanie nadmernej aktivácie reportérového génu luciferázy podobne ako pri fytoestrogénoch.

3. Pred použitím tejto skúšky na regulačné účely je potrebné prečítať si časti VŠEOBECNÝ ÚVOD a ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER. Vymedzenie pojmov a skratky použité v tomto usmernení na vykonávanie testov sú uvedené v dodatku 2.1.

PRINCÍP SKÚŠKY (POZRI AJ ČASŤ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

4. Skúška slúži na signalizovanie väzby estrogénového receptora s ligandom. Po naviazaní ligandu sa komplex receptora a ligandu premiestni do jadra, kde sa naviaže na konkrétne úseky DNA zodpovedné za reakciu a transaktivuje reportérový gén luciferázy svetlušky svätojánskej, čo vedie k zvýšenej bunkovej expresii enzýmu luciferázy. Luciferín je látka, ktorá sa prostredníctvom enzýmu luciferázy transformuje na bioluminiscenčný produkt, ktorý možno kvantitatívne merať pomocou luminometra. Pôsobenie luciferázy možno rýchlo a lacno vyhodnotiť pomocou viacerých komerčne dostupných testovacích súprav.

5. Tento testovací systém využíva bunkovú líniu hERα-HeLa-9 903, ktorá je odvodená od ľudského tumoru krčka maternice, s dvoma stabilne vloženými konštruktmi: i) konštrukt expresie hERα (ktorým sa kóduje ľudský receptor s plnou dĺžkou) a ii) reportérový konštrukt luciferázy svetlušky svätojánskej, ktorý nesie päť tandemových opakovaní úseku estrogénovej reakcie (ERE) vitelogenínu, riadený úsekom TATA promótora myšacieho metalotioneínu (MT). Najlepšia výkonnosť sa preukázala pri génovom konštrukte TATA myšacieho metalotioneínu, ktorý sa preto bežne používa. Pomocou tejto bunkovej línie hERα-HeLa-9 903 tak možno merať schopnosť testovanej chemikálie vyvolať transaktiváciu expresie génu luciferázy sprostredkovanú receptorom hERα.

▼M8

6. V prípade skúšky agonistu ER vychádza interpretácia údajov z toho, či maximálna úroveň reakcie vyvolaná testovanou chemikáliou je alebo nie je rovnaká, prípadne vyššia, ako agonistická reakcia rovnajúca sa 10 % reakcie, ktorú vyvoláva koncentrácia pozitívnej kontroly (PC), teda 17β-estradiolu (E2), s maximálnou indukciou (1 nM) (t. j. PC_{10}). V prípade skúšky antagonistu ER vychádza interpretácia údajov z toho, či reakcia vykazuje alebo nevykazuje najmenej 30 % zníženie pôsobenia oproti reakcii vyvolanej obohatenou kontrolou (25 pM E2) bez cytotoxicity. V odsekoch 34 – 48 sa podrobne opisuje analýza a interpretácia údajov.

POSTUP

Bunkové línie

7. Na túto skúšku sa používa stabilne transfektovaná bunková línia hERα-HeLa-9 903. Túto bunkovú líniu možno získať z bunkovej banky japonskej zbierky výskumných biologických zdrojov (JCRB) ([1]) po podpísaní dohody o prenose materiálu (MTA).

8. Pri testovaní sa používajú len bunky charakterizované neprítomnosťou mykoplazmy. Uprednostňovanou metódou na citlivú detekciu mykoplazmatickej infekcie je polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase (RT-PCR) (4) (5) (6).

Stabilita bunkovej línie

9. Na monitorovanie stability bunkovej línie sa majú v rámci skúšky agonistu použiť ako referenčné štandardy E2, 17α-estradiol, 17α-metyltestosterón a kortikosterón a minimálne raz počas každej skúšky má sa vykonať meranie úplnej krivky závislosti reakcie od koncentrácie v testovanom rozsahu koncentrácie uvedenom v tabuľke 1, pričom výsledky sa majú zhodovať s výsledkami uvedenými v tabuľke 1.

10. V prípade skúšky antagonistu sa súčasne pri každom testovacom cykle vykoná meranie úplných kriviek koncentrácie pre dva referenčné štandardy, tamoxifén a flutamid. Pri oboch chemikáliách je potrebné monitorovať správnu pozitívnu alebo negatívnu kvalitatívnu klasifikáciu.

Bunková kultúra a podmienky očkovania

11. Bunky sa uchovávajú v minimálnom základnom médiu podľa Eagla (EMEM) bez fenolovej červene, s pridaním 60 mg/l antibiotika kanamycínu a 10 % bovinného fetálneho séra ošetreného uhlím povrchovo upraveného dextránom (DCC-FBS) v inkubátore s atmosférou s obsahom CO_2 (5 % CO_2) pri teplote 37 °C ±1 °C. Pri dosiahnutí 75 – 90 % konfluencie možno bunky subkultivovať po 10 ml v objemoch $0{,}4 \times 10^5 – 1 \times 10^5$ buniek/ml na miskách pre bunkové kultúry s priemerom 100 mm. Bunky sa zmiešajú v podobe suspenzie s 10 % kultivačným médiom FBS-EMEM (ktoré je rovnaké ako médium EMEM so sérom DCC-FBS) a potom sa naočkujú do jamiek mikrotitračnej platničky s hustotou 1×10^4 buniek/(100 µl × jamka). Následne sa bunky počas 3 hodín pred expozíciou chemikálii preinkubujú v inkubátore s atmosférou s obsahom 5 % CO_2 pri teplote 37 °C ±1 °C. Plastové nádoby nesmú vykazovať žiadne estrogénové pôsobenie.

12. S cieľom zachovať integritu reakcie je potrebné bunky kultivovať vo viac než jednej pasáži zo zmrazenej kmeňovej kultúry v upravenom médiu a nemali by sa kultivovať vo viac než 40 pasážach. V prípade bunkovej línie hERα-HeLa-9 903 to bude trvať kratšie ako tri mesiace. Ak však bunky rastú v nevhodných kultivačných podmienkach, ich výkonnosť sa môže znížiť.

([1]) JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japonsko, faxové číslo: +81 72 641 9812.

▼M8

13. Médium DCC-FBS možno pripraviť podľa opisu v dodatku 2.2 alebo získať z komerčných zdrojov.

Kritériá prijateľnosti

Pozitívne a negatívne referenčné štandardy pre skúšku agonistu ER

14. Pred štúdiou a počas nej je potrebné overiť vnímavosť testovacieho systému pomocou vhodných koncentrácií silného estrogénu: E2, slabého estrogénu (17α-estradiol), veľmi slabého agonistu (17α-metyltestosterón) a negatívnej látky (kortikosterón). V tabuľke 1 sú uvedené prijateľné rozsahy hodnôt odvodené z validačnej štúdie (1). Tieto štyri súbežné referenčné štandardy majú byť súčasťou každého pokusu, pričom výsledky majú patriť do stanoveného rozsahu prijateľných hodnôt. V opačnom prípade je potrebné určiť príčinu nesplnenia kritérií prijateľnosti (napr. manipulovanie s bunkami, sérum a antibiotikum z hľadiska kvality a koncentrácie) a zopakovať skúšku. Po splnení kritérií prijateľnosti je nevyhnutné konzistentné používanie materiálov na kultivovanie buniek, aby sa zabezpečilo minimálne kolísanie hodnôt EC_{50}, PC_{50} a PC_{10}. Pomocou štyroch súbežných referenčných štandardov, ktoré majú byť súčasťou každého pokusu (uskutočnené za rovnakých podmienok vrátane materiálov, úrovne pasážovania buniek a odborných pracovníkov), možno zaistiť citlivosť skúšky, keďže hodnoty PC_{10} troch pozitívnych referenčných štandardov majú patriť do prijateľného rozsahu, rovnako ako hodnoty PC_{50} a EC_{50}, pokiaľ ich možno vypočítať (pozri tabuľku 1).

Tabuľka 1

Hodnoty prijateľného rozsahu štyroch referenčných štandardov pre skúšku agonistu ER

Názov	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Sklon krivky podľa Hillovej rovnice (Hill slope)	Testovací rozsah
17β-estradiol (E2) číslo CAS: 50-28-2	–11,4 ~ –10,1	<–11	–11,3 ~ –10,1	0,7 ~ 1,5	10^{-14} ~ 10^{-8}M
17α-estradiol číslo CAS: 57-91-0	–9,6 ~ –8,1	–10,7 ~ –9,3	–9,6 ~ –8,4	0,9 ~ 2,0	10^{-12} ~ 10^{-6}M
kortikosterón číslo CAS: 50-22-6	—	—	—	—	10^{-10} ~ 10^{-4}M
17α-metyltestosterón číslo CAS: 58-18-4	–6,0 ~ –5,1	–8,0 ~ –6,2	—	—	10^{-11} ~ 10^{-5}M

Pozitívne a negatívne referenčné štandardy pre skúšku antagonistu ER

15. Pred štúdiou a počas nej je potrebné overiť vnímavosť testovacieho systému pomocou vhodných koncentrácií pozitívnej látky (tamoxifén) a negatívnej látky (flutamid). V tabuľke 2 sú uvedené prijateľné rozsahy hodnôt odvodené z validačnej štúdie (1). Tieto dva súbežné referenčné štandardy majú byť súčasťou každého pokusu, pričom výsledky sa majú vyhodnotiť ako správne v súlade s kritériami. V opačnom prípade je potrebné určiť príčinu nesplnenia kritérií (napr. manipulovanie s bunkami, sérum a antibiotikum z hľadiska kvality a koncentrácie) a zopakovať skúšku. Okrem toho je potrebné vypočítať hodnoty IC_{50} pre pozitívnu látku (tamoxifén), pričom výsledky majú patriť do stanoveného rozsahu prijateľných hodnôt. Po splnení kritérií prijateľnosti je nevyhnutné konzistentné používanie materiálov na kultivovanie buniek, aby sa zabezpečilo minimálne kolísanie hodnôt IC_{50}. Pomocou týchto dvoch súbežných referenčných štandardov, ktoré majú byť súčasťou každého pokusu (uskutočnené za rovnakých podmienok vrátane materiálov, úrovne pasážovania buniek a odborných pracovníkov), možno zaistiť citlivosť skúšky (pozri tabuľku 2).

▼M8

Tabuľka 2

Kritériá a hodnoty prijateľného rozsahu dvoch referenčných štandardov pre skúšku antagonistu ER

Názov	Kritériá	$LogIC_{50}$	Testovací rozsah
tamoxifén číslo CAS: 10540-29-1	pozitívne: je potrebné vypočítať IC_{50}	–5,942 ~ –7,596	10^{-10} ~ 10^{-5} M
flutamid číslo CAS: 13311-84-7	negatívne: nie je potrebné vypočítať IC_{30}	—	10^{-10} ~ 10^{-5} M

Pozitívne kontroly a kontroly s nosičom

16. Pozitívna kontrola (PC) pre skúšku agonistu ER (1 nM E2) a pre skúšku antagonistu ER (10 μM TAM) sa má na každej mikrotitračnej platničke testovať najmenej trojmo. Nosič, ktorý sa používa na rozpustenie testovanej chemikálie, sa má na každej mikrotitračnej platničke testovať najmenej trojmo ako kontrola s nosičom (VC). Ak sa pri pozitívnej kontrole používa iný nosič ako pri testovanej chemikálii, okrem tejto kontroly s nosičom sa má testovať ďalšia kontrola s nosičom najmenej trojmo na rovnakej mikrotitračnej platničke s pozitívnou kontrolou.

Kritériá kvality pre skúšku agonistu ER

17. Stredná hodnota aktivity luciferázy pozitívnej kontroly (1 nM E2) má predstavovať najmenej štvornásobok strednej hodnoty kontroly s nosičom na každej mikrotitračnej platničke. Toto kritérium je stanovené na základe spoľahlivosti hodnôt sledovaných parametrov z validačnej štúdie (historicky v rozsahu štvornásobku až tridsaťnásobku).

18. Vzhľadom na kontrolu kvality skúšky má byť násobná indukcia zodpovedajúca hodnote PC_{10} súbežnej pozitívnej kontroly (1 nM E2) väčšia než 1+2 SD hodnoty násobnej indukcie (= 1) súbežnej kontroly s nosičom. Na účely stanovania priorít môže byť hodnota PC_{10} užitočná na zjednodušenie požadovanej analýzy údajov v porovnaní so štatistickou analýzou. Hoci štatistická analýza poskytuje informácie o významnosti, takáto analýza nepredstavuje kvantitatívny parameter, pokiaľ ide o potenciál z hľadiska koncentrácie, a preto je na účely stanovenia priorít menej užitočná.

Kritériá kvality pre skúšku antagonistu ER

19. Stredná hodnota aktivity luciferázy obohatenej kontroly (25 pM E2) má predstavovať najmenej štvornásobok strednej hodnoty kontroly s nosičom na každej mikrotitračnej platničke. Toto kritérium je stanovené na základe spoľahlivosti hodnôt sledovaných parametrov z validačnej štúdie.

20. Pokiaľ ide o kontrolu kvality skúšky, relatívna transkripčná aktivácia (RTA) 1 nM E2 má byť väčšia ako 100 %, RTA 1 μM 4-hydroxytamoxifénu (OHT) má byť menšia ako 40,6 % a RTA 100 μM digitonínu (Dig) má byť menšia ako 0 %.

Preukazovanie spôsobilosti laboratória (pozri odsek 14 a tabuľky 3 a 4 v časti ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER tejto testovacej metódy).

Nosič

21. Ako súbežná kontrola s nosičom sa použije dimetylsulfoxid (DMSO) alebo vhodné rozpúšťadlo v rovnakej koncentrácii, aká sa použila pri rozličných pozitívnych a negatívnych kontrolách a testovaných chemikáliách. Testované chemikálie sa rozpustia v rozpúšťadle, ktoré rozpúšťa testovanú chemikáliu a je miešateľné s bunkovým kultivačným médiom. Vhodnými nosičmi sú voda, etanol (s čistotou 95 % až 100 %) a DMSO. V prípade použitia DMSO nemá úroveň prekročiť 0,1 obj. %. Pri každom nosiči je potrebné preukázať, že maximálny použitý objem nie je cytotoxický a nenarušuje výkonnosť skúšky.

▼M8

Príprava testovaných chemikálií

22. Testované chemikálie sa vo všeobecnosti rozpustia v DMSO alebo inom vhodnom rozpúšťadle a sériovo sa zriedia s rovnakým rozpúšťadlom v bežnom pomere 1:10, čím sa pripravia roztoky určené na riedenie s kultivačnými médiami.

Rozpustnosť a cytotoxicita: Úvahy týkajúce sa zisťovania rozsahu

23. Je potrebné vykonať predbežný test s cieľom určiť vhodný rozsah koncentrácií chemikálie, ktorá sa má testovať, a presvedčiť sa, či pri testovanej chemikálii môžu vyskytnúť problémy z hľadiska rozpustnosti a cytotoxicity. Na začiatku sa chemikálie testujú po maximálnu koncentráciu 1 µl/ml, 1 mg/ml alebo 1 mM, podľa toho, ktorá je najnižšia. Na základe rozsahu cytotoxicity alebo nedostatočnej rozpustnosti zistenej v predbežnom teste sa pri prvom reálnom testovacom cykle chemikália testuje pri logaritmických sériových riedeniach, pričom sa začína od maximálnej prijateľnej koncentrácie (napr. 1 mM, 100 µM, 10 µM atď.) a zaznamená sa prítomnosť zakalenia alebo zrazeniny alebo výskyt cytotoxicity. Koncentrácie v druhom a podľa potreby v treťom testovacom cykle sa príslušne upravia, aby sa dosiahlo lepšie charakterizovanie krivky závislosti reakcie od koncentrácie a aby sa predišlo používaniu koncentrácií, pri ktorých sa zistí nerozpustnosť alebo nadmerná cytotoxicita.

24. Pri agonistoch a antagonistoch ER môže prítomnosť zvyšujúcich sa úrovní cytotoxicity výrazne ovplyvniť alebo vylúčiť typickú sigmoidálnu reakciu, čo je potrebné vziať do úvahy pri interpretácii údajov. Použiť sa majú metódy na testovanie cytotoxicity, pomocou ktorých možno získať informácie o 80 % životaschopnosti buniek, a to využitím vhodnej skúšky na základe skúseností laboratória.

25. Ak by z výsledkov testu cytotoxicity vyplynulo, že daná koncentrácia testovanej chemikálie znížila počet buniek najmenej o 20 %, táto koncentrácia sa bude považovať za cytotoxickú a koncentrácie na úrovni alebo nad úrovňou tejto cytotoxickej koncentrácie sa vylúčia z hodnotenia.

Chemická expozícia a usporiadanie mikrotitračnej platničky pri skúške

26. Postup riedení chemikálie (kroky 1 a 2) a expozíciu buniek chemikálii (krok 3) možno uskutočniť takto:

Krok 1: Každá testovaná chemikália sa sériovo rozriedi v DMSO alebo vo vhodnom rozpúšťadle a pridá sa do jamiek mikrotitračnej platničky, aby sa dosiahli konečné sériové koncentrácie určené predbežným testom na zistenie rozsahu [zvyčajne v sériách napríklad 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM a 10 pM (10^{-3} – 10^{-11} M)] pri testovaní vykonávanom trojmo.

Krok 2: Riedenie chemikálie: Najskôr rozrieďte 1,5 µl testovanej chemikálie v rozpúšťadle na dosiahnutie objemu 500 µl kultivačných médií.

Krok 3: Expozícia buniek chemikálii: Pridajte 50 µl roztoku s médiami (pripraveného v kroku 2) do skúšobnej jamky, ktorá obsahuje 10^4 buniek/100 µl/jamka.

Odporúčaný konečný objem médií pre každú jamku je 150 µl. Testovacie vzorky a referenčné štandardy možno priradiť podľa tabuľky 3 a 4.

▼M8

Tabuľka 3

Príklad priradenia koncentrácií referenčných štandardov na skúšobnej mikrotitračnej platničke pri skúške agonistu ER

Riadok	17α-metyltestosterón			Kortikosterón			17α-estradiol			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: kontrola s nosičom (0,1 % DMSO); PC: pozitívna kontrola (1 nM E2)

27. Pri každom testovacom cykle sa testujú referenčné štandardy (E2, 17α-estradiol, 17-μετψλτεστοστερμνναακορτικοστερκνννταβυτκακκκκκNa každej skúšobnej mikrotitračnej platničke sa nachádzajú jamky s pozitívnou kontrolou ošetrené 1 nM E2, ktorý môže vyvolať maximálnu indukciu E2, a jamky s kontrolou s nosičom ošetrené len DMSO (alebo vhodným rozpúšťadlom) (tabuľka 4). Ak sa v rámci rovnakého pokusu používajú bunky z rôznych zdrojov (napr. odlišný počet pasáží, odlišná šarža atď.), referenčné štandardy sa majú testovať pre každý zdroj buniek.

Tabuľka 4

Príklad priradenia koncentrácií testovaných chemikálií a kontrolných chemikálií na skúšobnej mikrotitračnej platničke pri skúške agonistu ER

Riadok	Testovaná chemikália 1			Testovaná chemikália 2			Testovaná chemikália 3			Testovaná chemikália 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**

Riadok	Testovaná chemikália 1			Testovaná chemikália 2			Testovaná chemikália 3			Testovaná chemikália 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: kontrola s nosičom (0,1 % DMSO); PC: pozitívna kontrola (1 nM E2)

Tabuľka 5

Príklad priradenia koncentrácií referenčných štandardov na skúšobnej mikrotitračnej platničke pri skúške antagonistu ER

Riadok	Tamoxifén			Flutamid			Testovaná chemikália 1			Testovaná chemikália 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: kontrola s nosičom (0,1 % DMSO), PC: pozitívna kontrola (1 nM E2), OHT: 4-hydroxytamoxifén, Dig: digitonín.

= obohatené o 25 pM E2

28. S cieľom vyhodnotiť antagonistické pôsobenie chemikálií sa skúšobné jamky v riadkoch A až G obohatia o 25 pM E2. Pri každom pokuse sa testujú referenčné štandardy (tamoxifén a flutamid). Na každej skúšobnej mikrotitračnej platničke sa majú nachádzať jamky s pozitívnou kontrolou ošetrené 1 nM E2, ktoré sa môžu použiť ako kontrola kvality bunkovej línie hERα-HeLa-9 903, jamky s kontrolou s nosičom ošetrené len DMSO (alebo vhodným rozpúšťadlom), jamky s obsahom 0,1 % DMSO ošetrené pridaním DMSO k obohatenému E2, čo zodpovedá „obohatenej kontrole“, jamky ošetrené konečnou koncentráciou 1 μM OHT a jamky ošetrené 100 μM Dig (tabuľka 5). Pri nasledujúcej skúšobnej mikrotitračnej platničke sa použije rovnaké rozloženie bez jamiek s referenčnými štandardmi (tabuľka 6). Ak sa v rámci rovnakého pokusu používajú bunky z rôznych zdrojov (napr. odlišný počet pasáží, odlišná šarža atď.), referenčné štandardy sa majú testovať pre každý zdroj buniek.

▼M8

Tabuľka 6

Príklad priradenia koncentrácií testovaných chemikálií a kontrolných chemikálií na skúšobnej mikrotitračnej platničke pri skúške antagonistu ER

Riadok	Testovaná chemikália 1			Testovaná chemikália 2			Testovaná chemikália 3			Testovaná chemikália 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: kontrola s nosičom (0,1 % DMSO), PC: pozitívna kontrola (1 nM E2), OHT: 4-hydroxytamoxifén, Dig: digitonín.

: obohatené o 25 pM E2

29. Je potrebné potvrdiť, že nedochádza k vplyvom v dôsledku umiestnenia na okraji. Ak existuje podozrenie na výskyt takýchto vplyvov, je potrebné zmeniť rozloženie na mikrotitračnej platničke, aby sa takýmto vplyvom predišlo. Na mikrotitračnej platničke možno použiť napríklad rozloženie, pri ktorom sa vylúči používanie krajných jamiek.

30. Po pridaní chemikálií sa skúšobné mikrotitračné platničky inkubujú v inkubátore s atmosférou s obsahom 5 % CO_2 pri teplote 37 °C ±1 °C počas 20 – 24 hodín, aby nastala indukcia produktov reportérových génov.

31. Osobitné faktory je potrebné zohľadniť v prípade zlúčenín s vysokou mierou prchavosti. V takom prípade sa môžu v blízkych jamkách s kontrolami prejaviť falošne pozitívne výsledky, preto je túto skutočnosť potrebné zvážiť z hľadiska očakávaných a historických hodnôt kontrol. V ojedinelých prípadoch, keď by prchavosť mohla spôsobovať obavy, môže použitie hermetických uzáverov platničiek prispieť k účinnému izolovaniu jednotlivých jamiek počas testovania, a preto sa v takýchto prípadoch odporúča.

32. S cieľom zaručiť nezávislosť sa majú opakované konečné testy tej istej chemikálie uskutočňovať v rôznych dňoch.

Skúška s luciferázou

33. Pri skúške možno použiť komerčný reagent na skúšku s luciferázou [napr. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510 alebo ekvivalent)] alebo štandardný systém na skúšku s luciferázou (napr. Promega, E1500 alebo ekvivalent), pokiaľ sú splnené kritériá prijateľnosti. Pri výbere reagentov skúšky je potrebné vychádzať z citlivosti luminometra, ktorý sa bude používať. Pri použití štandardného systému na skúšku s luciferázou sa pred pridaním substrátu má použiť reagent na lýzu bunkovej kultúry (napr. Promega, E1531 alebo ekvivalent). Reagent luciferázy sa má použiť podľa pokynov výrobcu.

ANALÝZA ÚDAJOV

Skúška agonistu ER

34. V prípade skúšky agonistu ER možno na získanie relatívnej transkripčnej aktivity v pozitívnej kontrole (1 nM E2) analyzovať luminiscenčné signály z tej istej mikrotitračnej platničky podľa týchto krokov (prijateľné sú aj iné ekvivalentné matematické postupy):

Krok 1. Vypočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom.

▼M8

Krok 2. Na normalizáciu údajov odpočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom od hodnoty jednotlivých jamiek.

Krok 3. Vypočítajte strednú hodnotu pre normalizovanú pozitívnu kontrolu.

Krok 4. Vydeľte normalizovanú hodnotu jednotlivých jamiek na mikrotitračnej platničke strednou hodnotou normalizovanej pozitívnej kontroly (PC = 100 %).

Konečná hodnota pre jednotlivé jamky predstavuje relatívnu transkripčnú aktivitu pre danú jamku v porovnaní s reakciou v pozitívnej kontrole.

Krok 5. Vypočítajte strednú hodnotu relatívnej transkripčnej aktivity pre každú skupinu koncentrácií testovanej chemikálie. Pri reakcii sa posudzujú dva rozmery: spriemerované transkripčné pôsobenie (reakcia) a koncentrácia, pri ktorej dochádza k reakcii (pozri nasledujúci oddiel).

Faktory v súvislosti s indukciou EC_{50}, PC_{50} a PC_{10}

35. Na výpočet hodnoty EC_{50} sa vyžaduje úplná krivka závislosti reakcie od koncentrácie, čo však nemusí byť vždy dosiahnuteľné ani praktické vzhľadom na obmedzenia rozsahu testovaných koncentrácií (napríklad pre problémy spojené s cytotoxicitou alebo rozpustnosťou). Keďže však hodnota EC_{50} a maximálna úroveň indukcie (ktorá zodpovedá najvyššej hodnote Hillovej rovnice) predstavujú informatívne parametre, tieto parametre by sa mali uvádzať, pokiaľ je to možné. Na výpočet hodnoty EC_{50} a maximálnej úrovne indukcie je potrebné použiť vhodný štatistický softvér (napr. Graphpad Prism). Ak sa Hillova logistická rovnica vzťahuje na údaje závislosti reakcie od koncentrácie, na výpočet hodnoty EC_{50} sa použije táto rovnica (7):

Y = dolný bod + (horný bod – dolný bod) / (1+10 exp ((log EC50 – X) × sklon krivky podľa Hillovej rovnice)), pričom:

X je logaritmus koncentrácie a

Y je reakcia, pričom Y sa začína v spodnom bode a prechádza k hornému bodu na sigmoidnej krivke. Spodná hodnota má v Hillovej logistickej rovnici fixnú hodnotu nula.

36. Pre každú testovanú chemikáliu je potrebné zadať:

hodnotu RPC_{Max}, čo je maximálna úroveň reakcie vyvolanej testovanou chemikáliou, vyjadrená ako percentuálny podiel reakcie vyvolanej 1 nM E2 na rovnakej mikrotitračnej platničke, ako aj PC_{Max} (koncentrácia priradená k hodnote RPC_{Max}) a

pri pozitívnych chemikáliách je potrebné zadať koncentrácie, ktoré vyvolávajú PC_{10} a, ak je to vhodné, PC_{50}.

37. Hodnoty PCx možno vypočítať interpoláciou medzi 2 bodmi na súradniciach X-Y, pričom jeden sa nachádza bezprostredne nad a druhý bezprostredne pod hodnotou PCx. Keď majú údajové body, ktoré ležia bezprostredne nad a pod hodnotou PCx, súradnice (a,b), resp. (c,d), hodnotu PCx možno vypočítať pomocou tejto rovnice:

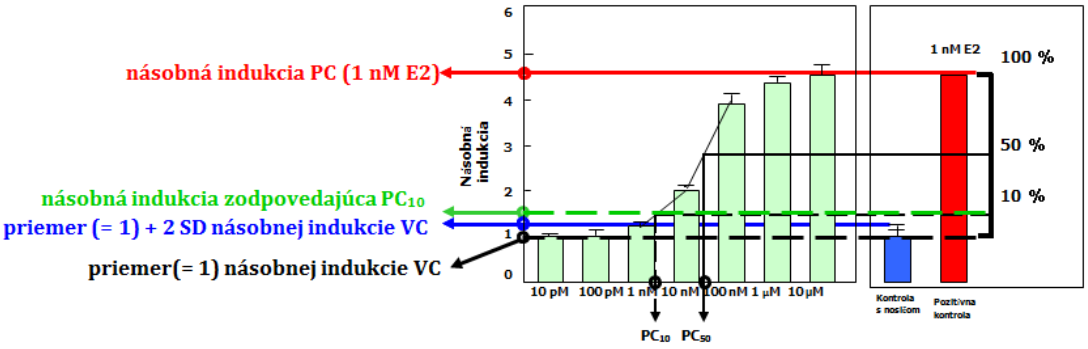
$$\log[PCx] = \log[c] + (x - d)/(d - b)$$

▼M8

38. Opis hodnôt pozitívnej kontroly je uvedený ďalej na obrázku 1.

Obrázok 1

Príklad spôsobu odvodenia hodnôt pozitívnej kontroly (PC). Pozitívna kontrola (1 nM E2) je súčasťou každej skúšobnej mikrotitračnej platničky



Skúška antagonistu ER

39. V prípade skúšky antagonistu ER možno na získanie relatívnej transkripčnej aktivity (RTA) v obohatenej kontrole (25 pM E2) analyzovať luminiscenčné signály z tej istej mikrotitračnej platničky podľa týchto krokov (prijateľné sú aj iné ekvivalentné matematické postupy):

Krok 1. Vypočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom.

Krok 2. Na normalizáciu údajov odpočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom od hodnoty jednotlivých jamiek.

Krok 3. Vypočítajte strednú hodnotu pre normalizovanú obohatenú kontrolu.

Krok 4. Vydeľte normalizovanú hodnotu jednotlivých jamiek na mikrotitračnej platničke strednou hodnotou normalizovanej obohatenej kontroly (obohatená kontrola = 100 %).

Konečná hodnota pre jednotlivé jamky predstavuje relatívnu transkripčnú aktivitu pre danú jamku v porovnaní s reakciou v obohatenej kontrole.

Krok 5. Vypočítajte strednú hodnotu relatívnej transkripčnej aktivity pre každé ošetrovanie.

Faktory v súvislosti s indukciou IC_{30} a IC_{50}

40. Pri pozitívnych chemikáliách je potrebné uviesť koncentrácie, ktoré vyvolávajú hodnoty IC_{30} a, ak je to vhodné, IC_{50}.

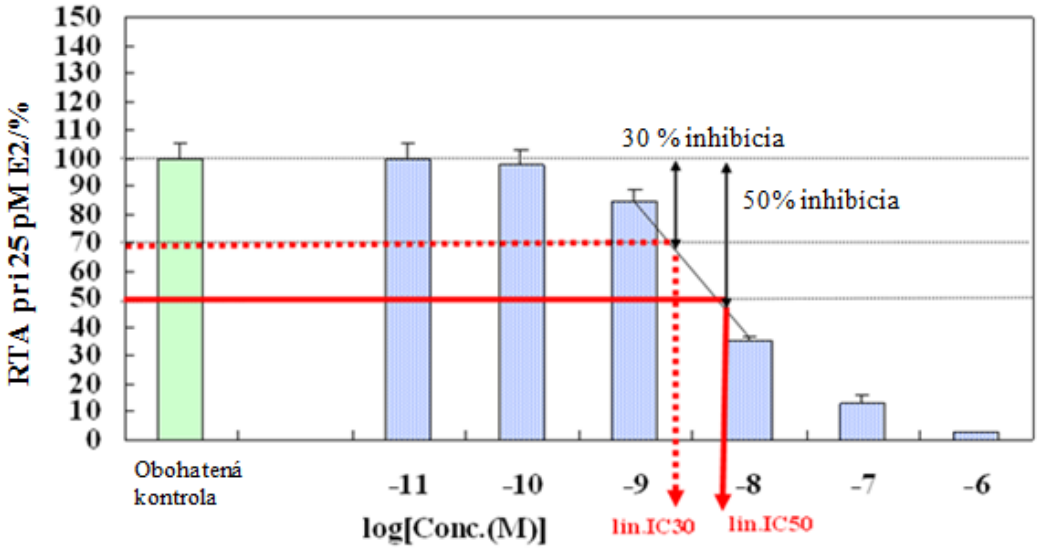
41. Hodnoty ICx možno vypočítať interpoláciou medzi 2 bodmi na súradniciach X-Y, pričom jeden sa nachádza bezprostredne nad a druhý bezprostredne pod hodnotou ICx. Keď majú údajové body, ktoré ležia bezprostredne nad a pod hodnotou ICx, súradnice (c,d), resp. (a,b), hodnotu ICx možno vypočítať pomocou tejto rovnice:

$$\text{lin ICx} = a - (b - (100 - x))\ (a - c)/(b - d)$$

▼M8

Obrázok 2

Príklad spôsobu odvodenia hodnôt IC. Obohatená kontrola (25 pM E2) je súčasťou každej skúšobnej mikrotitračnej platničky



RTA: relatívna transkripčná aktivita

42. Výsledky by mali byť založené na dvoch (alebo troch) nezávislých testovacích cykloch. Ak sa z dvoch testovacích cyklov získajú porovnateľné a tým aj reprodukovateľné výsledky, nie je nevyhnutné uskutočňovať tretí cyklus. Na to, aby boli výsledky prijateľné, musia:

— spĺňať kritériá prijateľnosti (pozri kritériá prijateľnosti v odsekoch 14 – 20),

— byť reprodukovateľné.

Kritériá na interpretáciu údajov

Tabuľka 7

Kritériá pre skúšku agonistu ER na rozhodnutie o tom, či je chemikália pozitívna alebo negatívna

Chemikália je pozitívna	Ak sa získa hodnota RPC_{Max}, ktorá sa rovná alebo prekračuje 10 % reakcie pozitívnej kontroly najmenej v dvoch z dvoch alebo v dvoch z troch testovacích cyklov.
Chemikália je negatívna	Ak hodnota RPC_{Max} nedosiahne aspoň 10 % reakcie pozitívnej kontroly v dvoch z dvoch alebo v dvoch z troch testovacích cyklov.

Tabuľka 8

Kritériá pre skúšku antagonistu ER na rozhodnutie o tom, či je chemikália pozitívna alebo negatívna

Chemikália je pozitívna	Ak sa vypočíta hodnota IC_{30} najmenej v dvoch z dvoch alebo v dvoch z troch testovacích cyklov.
Chemikália je negatívna	Ak sa nevypočíta hodnota IC_{30} v dvoch z dvoch alebo v dvoch z troch testovacích cyklov.

▼M8

43. Kritériá na interpretáciu údajov sú uvedené v tabuľkách 7 a 8. Pozitívne výsledky bude charakterizovať rozsah účinku a koncentrácie, pri ktorej k účinku dochádza. Oba tieto ciele sú splnené, keď sa výsledky vyjadria ako koncentrácia, pri ktorej sa dosahuje 50 % (PC_{50}) alebo 10 % (PC_{10}) hodnôt pozitívnej kontroly v prípade skúšky agonistu a pri ktorej dochádza k inhibícii 50 % (IC_{50}) alebo 30 % (IC_{30}) hodnoty obohatenej kontroly v prípade skúšky antagonistu. Testovaná chemikália sa však považuje za pozitívnu, ak sa maximálna reakcia vyvolaná testovanou chemikáliou (RPC_{Max}) rovná alebo prekračuje 10 % reakcie pozitívnej kontroly najmenej v dvoch z dvoch alebo v dvoch z troch testovacích cyklov, a naopak, testovaná chemikália sa považuje za negatívnu, ak hodnota RPC_{Max} nedosiahne aspoň 10 % reakcie pozitívnej kontroly v dvoch z dvoch alebo v dvoch z troch testovacích cyklov.

44. Výpočty hodnôt PC_{10}, PC_{50} a PC_{Max} v skúške agonistu ER a IC_{30} a IC_{50} v skúške antagonistu ER možno uskutočniť pomocou výpočtových tabuliek dostupných v rámci usmernenia na vykonávanie testov na verejnej webovej lokalite OECD ([1]).

45. Malo by byť postačujúce, ak sa získajú hodnoty PC_{10} alebo PC_{50} a IC_{30} alebo IC_{50} aspoň dvakrát. Ak by sa však pri výslednom základe údajov v rovnakom rozsahu koncentrácií prejavilo kolísanie s neprijateľne vysokým variačným koeficientom (CV; %), údaje nemožno považovať za spoľahlivé a je potrebné identifikovať zdroj tohto výrazného kolísania. Variačný koeficient trojíc nespracovaných údajov (t. j. údajov o luminiscenčnej intenzite) údajových bodov, ktoré slúžia na výpočet hodnoty PC_{10}, má byť menej ako 20 %.

46. Splnenie kritérií prijateľnosti naznačuje, že skúšobný systém funguje správne, nie je však zabezpečené, že z ktoréhokoľvek konkrétneho testovacieho cyklu vyplynú presné údaje. Duplikovanie výsledkov prvého cyklu je najlepším potvrdením toho, že boli generované presné údaje.

47. Ak sa v skúške agonistu ER vyžaduje viac informácií na ďalšie účely popri účele skríningu a stanovenia priorít tohto usmernenia na vykonávanie testov pozitívnych testovaných chemikálií, obzvlášť chemikálií v rozsahu PC_{10} – PC_{49}, ako aj chemikálií, pri ktorých existuje podozrenie na nadmernú stimuláciu luciferázy, možno potvrdiť, že pozorovaná aktivita luciferázy je výlučne reakciou špecifickou pre ERα, a to prostredníctvom antagonistu ERα (pozri dodatok 2.1).

SPRÁVA O TESTE

48. Pozri odsek 20 v časti ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER

LITERATÚRA

(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

Dodatok 2.1

FALOŠNE POZITÍVNE VÝSLEDKY POSÚDENIE LUMINISCENČNÝCH SIGNÁLOV, KTORÉ NEBOLI SPROSTREDKOVANÉ RECEPTOROM

1. Falošne pozitívne výsledky v skúške agonistu ER môžu byť spôsobené aktiváciou génu luciferázy, ktorá nie je sprostredkovaná ER, priamou aktiváciou génového produktu alebo nesúvisiacou fluorescenciou. Takéto účinky naznačuje neúplná alebo nezvyčajná krivka závislosti odozvy od dávky. Ak existuje podozrenie na výskyt takýchto účinkov, je potrebné preskúmať účinok antagonistu ER [napr. 4-hydroxytamoxifénu (OHT) v netoxickej koncentrácii] na reakciu. Čistý antagonista ICI 1827 80 nemusí byť vhodný na tento účel, keďže dostatočná koncentrácia ICI 1827 80 môže znížiť hodnotu kontroly s nosičom, čo ovplyvní analýzu údajov.

2. S cieľom zabezpečiť validitu tohto prístupu je na tej istej mikrotitračnej platničke potrebné testovať:

   — agonistické pôsobenie neznámej chemikálie za prítomnosti/bez prítomnosti10 μM OHT,

   — kontrolu s nosičom (trojmo),

   — OHT (trojmo),

   — 1 nM E2 (trojmo) ako agonistickú pozitívnu kontrolu,

   — 1 nM E2 + OHT (trojmo).

Kritériá na interpretáciu údajov

Poznámka: Všetky jamky je potrebné ošetriť rovnakou koncentráciou nosiča.

— Ak ošetrenie antagonistom ER NEOPLYVNÍ agonistické pôsobenie neznámej chemikálie, chemikália sa označí ako negatívna.

— Ak dôjde k úplnej inhibícii agonistického pôsobenia neznámej chemikálie, použite rozhodovacie kritériá.

— Ak sa agonistické pôsobenie pri najnižšej koncentrácii rovná alebo je vyššie než reakcia pri PC_{10}, inhibícia neznámej chemikálie sa rovná alebo je vyššia než reakcia pri PC_{10}. Vypočíta sa rozdiel v reakciách medzi neošetrenými a ošetrenými jamkami s antagonistom ER, pričom tento rozdiel sa považuje za skutočnú reakciu a má sa používať pri výpočte príslušných parametrov, aby bolo možné prijať rozhodnutie o klasifikácii.

Analýza údajov

Skontrolujte normu výkonnosti.

Skontrolujte CV medzi jamkami ošetrenými za rovnakých podmienok.

1. Vypočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom.

2. Odpočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom od hodnoty jednotlivých jamiek, ktoré **nie sú** ošetrené OHT.

3. Vypočítate strednú hodnotu OHT.

4. Odpočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom od hodnoty jednotlivých jamiek, ktoré sú ošetrené OHT.

5. Vypočítajte strednú hodnotu pozitívnej kontroly.

6. Vypočítajte relatívnu transkripčnú aktivitu pre všetky ostatné jamky vzhľadom na pozitívnu kontrolu.

▼M8

Dodatok 2.2

PRÍPRAVA SÉRA OŠETRENÉHO UHLÍM POVRCHOVO UPRAVENÝM DEXTRÁNOM (DCC)

1. Ošetrenie séra uhlím povrchovo upraveným dextránom (DCC) je všeobecnou metódou na odstránenie estrogénových zlúčenín zo séra, ktoré sa pridáva k bunkovému médiu, aby sa vylúčila možnosť skreslenej reakcie v súvislosti so zvyškovými estrogénmi v sére. Týmto postupom možno ošetriť 500 ml bovinného fetálneho séra (FBS).

Zložky

2. Vyžadujú sa tieto materiály a zariadenie:

Materiály

aktívne uhlie,

dextrán,

hexahydrát chloridu horečnatého ($MgCl_2$ $6H_2O$),

sacharóza,

1 M tlmivého roztoku HEPES (pH 7,4),

ultračistá voda z filtrovacieho systému.

Zariadenie

sklená nádoba (zodpovedajúcej veľkosti) sterilizovaná v autokláve, bežná laboratórna odstredivka (s možnosťou nastavenia teploty na 4 °C).

Postup

3. Tento postup je prispôsobený používaniu odstredivkových skúmaviek s objemom 50 ml:

[1. deň] Pripravte si suspenziu uhlia povrchovo upraveného dextránom s 1 l ultračistej vody s obsahom 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 M sacharózy, 2,5 g uhlia, 0,25 g dextránu a 5 mM HEPES a premiešavajte pri teplote 4 °C do ďalšieho dňa.

[2. deň] Rozdeľte suspenziu do odstredivkových skúmaviek s objemom 50 ml a odstreďujte 10 minút pri 10 000 ot./min. pri teplote 4 °C. Odstráňte supernatant a uskladnite polovicu usadeniny uhlia pri teplote 4 °C na použitie na 3. deň. Rozmiešajte na suspenziu druhú polovicu uhlia s FBS, ktoré bolo pomaly rozmrazené, aby nedošlo k zrážaniu, a ktoré bolo tepelne inaktivované počas 30 minút pri teplote 56 °C, a potom suspenziu preneste do sklenej nádoby sterilizovanej v autokláve, napríklad do Erlenmeyerovej banky. Suspenziu pomaly premiešavajte pri teplote 4 °C do ďalšieho dňa.

[3. deň] Rozdeľte suspenziu s FSB do odstredivkových skúmaviek a odstreďujte 10 minút pri 10 000 ot./min. pri teplote 4 °C. Zozbierajte FBS a preneste ho do novej usadeniny uhlia, ktorá bola pripravená a uskladnená na 2. deň. Rozmiešajte usadeninu uhlia a pomaly túto suspenziu premiešavajte do ďalšieho dňa pri teplote 4 °C v sklenej nádobe sterilizovanej v autokláve.

[4. deň] Suspenziu rozdeľte a odstreďujte 10 minút pri 10 000 ot./min. pri teplote 4 °C a sterilizujte supernatant filtrovaním cez sterilný filter s veľkosťou otvorov 0,2 μm. Toto bovinné fetálne sérum ošetrené uhlím povrchovo upraveným dextránom sa má skladovať pri teplote -20 °C a možno ho používať až jeden rok.

▼**M8**

Dodatok 3

SKÚŠKA TRANSAKTIVÁCIE ESTROGÉNOVÝCH RECEPTOROV BUNKOVEJ LÍNIE VM7LUC NA IDENTIFIKOVANIE AGONISTOV A ANTAGONISTOV ESTROGÉNOVÝCH RECEPTOROV

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA (POZRI AJ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Pri tejto skúške sa používa bunková línia VM7Luc4E2 ([1]). Validovali ju Medziagentúrne centrum NTP pre hodnotenie alternatívnych toxikologických metód (NICEATM – National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods), ako aj Medziagentúrny koordinačný výbor pre validáciu alternatívnych metód (ICCVAM – Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1). Pri bunkových líniách VM7Luc dochádza k prevládajúcej expresii endogénneho ERα a malého množstva endogénneho ERβ (2) (3) (4).

2. Túto skúšku možno použiť na širokú škálu látok za predpokladu, že ich možno rozpustiť v dimetylsulfoxide (DMSO; registračné číslo CAS 67-68-5), nereagujú s DMSO ani s médiom na kultiváciu buniek a nie sú cytotoxické pri testovaných koncentráciách. Ak nemožno použiť DMSO, je možné použiť iný nosič, napríklad etanol alebo vodu (pozri odsek 12). Z preukázanej výkonnosti skúšky agonistu/antagonistu VM7Luc ER TA vyplýva, že údaje získané pomocou tejto skúšky môžu poskytovať informácie o mechanizmoch účinku sprostredkovaných estrogénovými receptormi (ER) a možno ich zvážiť pri stanovení priorít látok určených na ďalšie testovanie.

3. Táto skúška je osobitne navrhnutá na detekciu transaktivácie sprostredkovanej receptorom hERα a hERß, pričom ako sledovaný parameter sa meria chemiluminiscencia. Chemiluminiscencia má široké možnosti využitia v biologických analýzach, pretože luminiscencia poskytuje vysoký pomer signál-šum (10). Aktivitu luciferázy svetlušky svätojánskej v bunkových testoch môžu však zneprehľadniť látky, ktoré spôsobujú inhibíciu enzýmu luciferázy, čím dochádza k zdanlivej inhibícii aj k zvýšenej luminiscencii v dôsledku stabilizácie bielkovín (10). Pri niektorých skúškach zameraných na reportérový gén ER a používajúcich luciferázu sa však pri koncentráciách fytoestrogénu vyšších ako 1 μM uvádzal výskyt luminiscenčných signálov, ktoré neboli sprostredkované receptorom, a to pre nadmernú aktiváciu reportérového génu luciferázy (9) (11). Zatiaľ čo z krivky závislosti odozvy od dávky vyplýva, že ku skutočnej aktivácii systému estrogénových receptorov dochádza pri nižších koncentráciách, v systémoch skúšok stabilne transfektovanej transaktivácie estrogénových receptorov (see Appendix 2) je potrebné dôkladne preskúmať expresiu luciferázy dosahovanú pri vysokých koncentráciách fytoestrogénov alebo podobných zlúčenín, pri ktorých existuje podozrenie na vyvolanie nadmernej aktivácie reportérového génu luciferázy podobne ako pri fytoestrogénoch.

4. Pred použitím tejto skúšky na regulačné účely je potrebné prečítať si časti VŠEOBECNÝ ÚVOD a ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER. Vymedzenie pojmov a skratky použité v tejto testovacej metóde sú uvedené v dodatku 1.

([1]) Pred júnom 2016 sa táto bunková línia označovala ako BG1Luc. Bunky BG-1 pôvodne opísal Geisinger a kol. (1998) (12) a neskôr boli charakterizované výskumníkmi z inštitútu NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences) (13). Relatívne nedávno sa zistilo, že existujú dva odlišné varianty buniek BG-1, ktoré používajú výskumníci, a to BG-1 Fr a BG-1 NIEHS. Z hĺbkovej analýzy (vrátane testovania DNA) týchto dvoch variantov bunkových línií BG-1, ktoré vykonal Li a spolupracovníci (2014) (14), vyplynulo, že BG-1 Fr je jedinečná a že BG-1 NIEHS, teda pôvodná bunková línia, ktorá sa pri skúške používala, nie je bunkovou líniou ľudského karcinómu vaječníkov BG1, ale variantom bunkovej línie ľudského karcinómu prsníka MCF7. Bunková línia použitá v skúške, pôvodne označovaná ako BG1Luc4E2 (15), sa už bude označovať ako VM7Luc4E2 („V“ = variant; „M7“ = bunky MCF7). Podobne skúška sa bude odteraz označovať ako VM7Luc ER TA. Hoci sa týmto mení pôvod bunkovej línie, na ktorej je skúška založená, nemá to vplyv na publikované validačné štúdie ani na použitie a aplikáciu tejto skúšky na skríning estrogénových/antiestrogénových chemikálií.

▼M8

PRINCÍP SKÚŠKY (POZRI AJ ČASŤ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

5. Táto skúška slúži na určenie naviazania ligandu ER a následného premiestnenia komplexu receptora a ligandu do jadra. V jadre sa komplex receptora a ligandu naviaže na konkrétne úseky DNA zodpovedné za reakciu a transaktivuje reportérový gén (*luc*), čo vedie k produkcii luciferázy a následnej emisii svetla, ktorú možno kvantifikovať pomocou luminometra. Aktivitu luciferázy možno rýchlo a lacno vyhodnotiť pomocou viacerých komerčne dostupných súprav. Pri skúške VM7Luc ER TA sa na detekciu látok s agonistickým alebo antagonistickým pôsobením na estrogénové receptory *in vitro* využíva VM7 – bunková línia ľudského adenokarcinómu prsníka reagujúca na ER, ktorá bola stabilne transfektovaná pomocou reportérového konštruktu *luc* riadeného štyrmi úsekmi estrogénovej reakcie nachádzajúcimi sa pred oblasťou promótora MMTV (vírusu nádoru mliečnych žliaz myší). Tento promótor MMTV vykazuje len nízku krížovú reaktivitu s inými steroidnými a nesteroidnými hormónmi (8). Kritériá na interpretáciu údajov sú podrobne opísané v odseku 41. Stručne možno uviesť, že pozitívnu reakciu identifikuje krivka závislosti reakcie od koncentrácie, ktorá obsahuje najmenej tri body s neprekrývajúcimi sa pásmami odchýlky (stredná hodnota ± SD), ako aj zmena amplitúdy [normalizovaná relatívna svetelná jednotka (RLU)] najmenej o 20 % maximálnej hodnoty referenčného štandardu [17β-estradiol (E2; registračné číslo CAS 50-28-2) pri skúške agonistu, raloxifén HCl (Ral; registračné číslo CAS 84449-90-1)/E2 pri skúške antagonistu].

POSTUP

Bunková línia

6. Na túto skúšku sa používa stabilne transfektovaná bunková línia VM7Luc4E2. Táto bunková línia je v súčasnosti dostupná len na základe technickej licenčnej zmluvy od University of California, Davis, Kalifornia, USA ([1]) a od spoločnosti Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, Severná Karolína, USA ([2]).

Stabilita bunkovej línie

7. S cieľom zachovať stabilitu a integritu bunkovej línie je potrebné bunky kultivovať vo viac než jednej pasáži zo zmrazenej kmeňovej kultúry v médiách určených na udržiavanie buniek (pozri odsek 9). Kultivácia buniek nemá presiahnuť 30 pasáží. V prípade bunkovej línie VM7Luc4E2 bude 30 pasáží trvať približne tri mesiace.

Bunková kultúra a podmienky očkovania

8. Je potrebné dodržiavať postupy uvedené v usmernení o osvedčenom postupe kultivácie buniek (5) (6), aby sa zaručila kvalita všetkých materiálov a metód s cieľom zachovať integritu, validitu a reprodukovateľnosť uskutočnených činností.

9. Bunky VM7Luc4E2 sa udržiavajú v médiu RPMI 1 640 doplnenom o 0,9 % zmesi Pen-Strep a 8,0 % bovinného fetálneho séra (FBS) v špecializovanom inkubátore pre tkanivové kultúry pri teplote 37 °C ±1 °C, vlhkosti 90 % ±5 % a v atmosfére s obsahom 5,0 % ±1 % CO_2 vo vzduchu.

10. Po dosiahnutí konfluencie na úrovni ~80 % sa bunky VM7Luc4E2 subkultivujú a umiestnia na 48 hodín do prostredia bez prítomnosti estrogénu. Následne sa bunky naočkujú do 96-jamkových mikrotitračných platničiek na účely vystavenia testovaným chemikáliám a analýzy indukcie aktivity luciferázy v závislosti od estrogénu. Médium bez prítomnosti

([1]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, e-mail: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649.

([2]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, e-mail: info@dioxins.com, tel.: 919-688-4804, fax: 919-688-4404.

▼M8

estrogénu (EFM) obsahuje Dulbeccovu modifikáciu Eaglovho média (DMEM) bez fenolovej červene, s pridaním 4,5 % FBS ošetreného uhlím/dextránom, 1,9 % L-glutamínu a 0,9 % zmesi Pen-Strep. Všetky plastové nádoby musia vykazovať nulové estrogénové pôsobenie [pozri podrobný protokol (7)].

Kritériá prijateľnosti

11. Prijatie alebo zamietnutie testu vychádza z hodnotenia výsledkov týkajúcich sa referenčných štandardov a kontrol dosiahnutých pri jednotlivých pokusoch uskutočnených na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke. Každý referenčný štandard sa testuje pri viacerých koncentráciách, pričom z jednotlivých koncentrácií referenčných štandardov a kontrol existujú viaceré vzorky. Výsledky sa porovnávajú s kontrolami kvality (QC) pre tieto parametre, ktoré boli odvodené z historických databáz agonistov a antagonistov vytvorených jednotlivými laboratóriami v rámci preukázania spôsobilosti. Historické databázy sa priebežne aktualizujú hodnotami pre referenčné štandardy a kontroly. V prípade zmien zariadenia alebo laboratórnych podmienok môže byť potrebné vytvorenie aktualizovaných historických databáz.

Test agonistu

Test na zistenie rozsahu

- Indukcia: Indukcia v rámci mikrotitračnej platničky sa meria tak, že sa priemerná hodnota relatívnej svetelnej jednotky (RLU) pri najvyššej koncentrácii referenčného štandardu E2 vydelí priemernou hodnotou RLU kontroly s DMSO. Zvyčajne sa dosahuje päťnásobná indukcia, na účely prijatia však má byť indukcia najmenej štvornásobná.

- Výsledky kontroly s DMSO: Hodnoty RLU kontroly s aplikáciou rozpúšťadla majú byť v rámci 2,5-násobku štandardnej odchýlky strednej hodnoty RLU historickej kontroly s aplikáciou rozpúšťadla.

- Pokus, pri ktorom nie je splnené niektoré z týchto kritérií prijateľnosti, sa zruší a zopakuje.

Komplexný test

Zahŕňa kritériá prijateľnosti testu agonistu na zistenie rozsahu a tieto ďalšie kritériá:

- Výsledky získané pri referenčnom štandarde: Krivka závislosti reakcie od koncentrácie vzťahujúca sa na referenčný štandard E2 má mať sigmoidálny tvar, pričom najmenej tri hodnoty sa majú nachádzať v lineárnej časti krivky závislosti reakcie od koncentrácie.

- Výsledky získané pri pozitívnej kontrole: Hodnoty RLU kontroly s metoxychlórom majú byť vyššie ako stredná hodnota kontroly s DMSO plus trojnásobok štandardnej odchýlky od strednej hodnoty kontroly s DMSO.

- Pokus, pri ktorom nie je splnené niektoré z týchto kritérií prijateľnosti, sa zruší a zopakuje.

Test antagonistu

Test na zistenie rozsahu

- Redukcia: Redukcia v rámci mikrotitračnej platničky sa meria tak, že sa priemerná najvyššia hodnota RLU referenčného štandardu Ral/E2 vydelí priemernou hodnotou RLU kontroly s DMSO. Zvyčajne sa dosahuje päťnásobná redukcia, na účely prijatia však má byť redukcia najmenej trojnásobná.

- Výsledky získané pri kontrole s E2: Hodnoty RLU kontroly s E2 majú byť v rámci 2,5-násobku štandardnej odchýlky strednej hodnoty RLU historickej kontroly s E2.

▼M8

- Výsledky kontroly s DMSO: Hodnoty RLU kontroly s DMSO majú byť v rámci 2,5-násobku štandardnej odchýlky strednej hodnoty RLU historickej kontroly s aplikáciou rozpúšťadla.

- Pokus, pri ktorom nie je splnené niektoré z týchto kritérií prijateľnosti, sa zruší a zopakuje.

Komplexný test

Zahŕňa kritériá prijateľnosti testu antagonistu na zistenie rozsahu a tieto ďalšie kritériá:

- Výsledky získané pri referenčnom štandarde: Krivka závislosti reakcie od koncentrácie vzťahujúca sa na referenčný štandard Ral/E2 má mať sigmoidálny tvar, pričom najmenej tri hodnoty sa majú nachádzať v lineárnej časti krivky závislosti reakcie od koncentrácie.

- Výsledky získané pri pozitívnej kontrole: Hodnoty RLU kontroly s E2/tamoxifénom majú byť nižšie ako stredná hodnota kontroly s E2 mínus trojnásobok štandardnej odchýlky od strednej hodnota kontroly s E2.

- Pokus, pri ktorom nie je splnené niektoré z týchto kritérií prijateľnosti, sa zruší a zopakuje.

Referenčné štandardy, pozitívne kontroly a kontroly s nosičom

Kontrola s nosičom (skúšky agonistu a antagonistu)

12. Nosič, ktorý sa používa na rozpustenie testovaných chemikálií, sa má testovať ako kontrola s nosičom. Ako nosič sa pri validácii skúšky VM7Luc ER TA použil dimetylsulfoxid (DMSO, registračné číslo CAS 67-68-5) v koncentrácii 1 obj. % (pozri odsek 24). Ak sa použije iný nosič ako DMSO, všetky referenčné štandardy, kontroly a testované chemikálie sa majú podľa potreby testovať s rovnakým nosičom.

Referenčný štandard (test agonistu na zistenie rozsahu)

13. Referenčný štandard je E2 (registračné číslo CAS 50-28-2). Pri testovaní na zistenie rozsahu je referenčný štandard zložený zo sériového riedenia štyroch koncentrácií E2 ($1{,}84 \times 10^{-10}$, $4{,}59 \times 10^{-11}$, $1{,}15 \times 10^{-11}$ a $2{,}87 \times 10^{-12}$ M), pričom sa každá koncentrácia testuje v jamkách dvojmo.

Referenčný štandard (komplexný test agonistu)

14. Referenčný štandard E2 na komplexné testovanie je zložený zo sériového riedenia 1:2 pozostávajúceho z 11 koncentrácií E2 (v rozsahu od $3{,}67 \times 10^{-10}$ do $3{,}59 \times 10^{-13}$ M) v jamkách dvojmo.

Referenčný štandard (test antagonistu na zistenie rozsahu)

15. Referenčný štandard je kombinácia Ral (registračné číslo CAS 84449-90-1) a E2 (registračné číslo CAS 50-28-2). Pri testovaní na zistenie rozsahu je referenčný štandard Ral/E2 zložený zo sériového riedenia troch koncentrácií Ral ($3{,}06 \times 10^{-9}$, $7{,}67 \times 10^{-10}$a $1{,}92 \times 10^{-10}$ M) plus z pevne určenej koncentrácie E2 ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) v jamkách dvojmo.

Referenčný štandard (komplexný test antagonistu)

16. Referenčný štandard Ral/E2 na komplexné testovanie je zložený zo sériového riedenia Ral v pomere 1:2 (v rozsahu od $2{,}45 \times 10^{-8}$ do $9{,}57 \times 10^{-11}$ M) plus z pevne určenej koncentrácie E2 ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M), pričom obsahuje deväť koncentrácií Ral/E2 v jamkách dvojmo.

Slabá pozitívna kontrola (agonista)

17. Slabá pozitívna kontrola je $9{,}06 \times 10^{-6}$ M *p,p'*-metoxychlóru (metoxychlór; registračné číslo CAS 72-43-5) v médiu EFM.

▼M8

Slabá pozitívna kontrola (antagonista)

18. Slabá pozitívna kontrola je zložená z tamoxifénu (registračné číslo CAS 10540-29-1) 3,36 x 10^{-6} M s 9,18 × 10^{-11} M E2 v médiu EFM.

Kontrola s E2 (len pri skúške antagonistu)

19. Kontrola s E2 predstavuje 9,18 × 10^{-11} M E2 v médiu EFM a slúži ako základná negatívna kontrola.

Násobná indukcia (agonista)

20. Indukcia aktivity luciferázy vyvolaná referenčným štandardom (E2) sa meria tak, že sa priemerná najvyššia hodnota RLU referenčného štandardu E2 vydelí priemernou hodnotou RLU kontroly s DMSO, pričom výsledok má byť viac ako štvornásobok.

Násobná redukcia (antagonista)

21. Priemerná aktivita luciferázy vyvolaná referenčným štandardom (Ral/E2) sa meria tak, že sa priemerná najvyššia hodnota RLU referenčného štandardu Ral/E2 vydelí strednou hodnotou RLU kontroly s DMSO, pričom má byť viac ako trojnásobná.

Preukazovanie spôsobilosti laboratória (pozri odsek 14 a tabuľky 3 a 4 v časti ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER tejto testovacej metódy)

Nosič

22. Testované chemikálie sa rozpustia v rozpúšťadle, ktoré rozpúšťa testovanú chemikáliu a je miešateľné s bunkovým médiom. Vhodnými nosičmi sú voda, etanol (s čistotou 95 % až 100 %) a DMSO. V prípade použitia DMSO nemá úroveň prekročiť 1 obj. %. Pri každom nosiči je potrebné preukázať, že maximálny použitý objem nie je cytotoxický a nenarušuje vykonávanie skúšky. Referenčné štandardy a kontroly sa rozpustia v 100 % rozpúšťadle a potom sa rozriedia na vhodné koncentrácie v médiu EFM.

Príprava testovaných chemikálií

23. Testované chemikálie sa rozpustia v 100 % DMSO (alebo vhodnom rozpúšťadle) a potom sa rozriedia na vhodné koncentrácie v médiu EFM. Pred rozpustením a rozriedením sa majú všetky testované chemikálie nechať ustáliť pri izbovej teplote. Roztoky testovaných chemikálií sa majú pripraviť čerstvo pre každý pokus. V roztokoch nemá byť viditeľná zrazenina ani zakalenie. Referenčné štandardy a kontroly možno pripraviť vo väčšom množstve do zásoby, konečný referenčný štandard, riedenia kontrol a testované chemikálie je však potrebné pripraviť čerstvo pre každý pokus a použiť do 24 hodín od prípravy.

Rozpustnosť a cytotoxicita: Úvahy týkajúce sa zisťovania rozsahu

24. Súčasťou testovania na zistenie rozsahu sú sedembodové sériové riedenia v pomere 1:10 uskutočňované dvojmo. Na začiatku sa testované chemikálie testujú po maximálnu koncentráciu 1 mg/ml (~1 mM) pri testovaní agonistu a 20 μg/ml (~10 μM) pri testovaní antagonistu. Pomocou pokusov na zistenie rozsahu sa určujú:

— počiatočné koncentrácie testovaných chemikálií, ktoré sa majú použiť počas komplexného testovania,

— riedenia testovaných chemikálií (1:2 alebo 1:5), ktoré sa majú použiť počas komplexného testovania.

▼M8

25. Súčasťou protokolov skúšok agonistov a antagonistov (7) je posúdenie životaschopnosti buniek/cytotoxicity, ktoré je začlenené do testovania na zistenie rozsahu a komplexného testovania. Ako metóda na určenie cytotoxicity sa na posúdenie životaschopnosti buniek počas validácie skúšky VM7Luc ER TA (1) použila škálovaná kvalitatívna metóda vizuálneho skúmania, na určenie cytotoxicity však možno použiť kvantitatívnu metódu [pozri protokol (7)]. Údaje z koncentrácií testovaných chemikálií, ktoré spôsobujú viac ako 20 % zníženie životaschopnosti, nemožno použiť.

Expozícia testovanej chemikálii a usporiadanie mikrotitračnej platničky pri skúške

26. Bunky sa spočítajú a naočkujú na 96-jamkové mikrotitračné platničky pre tkanivové kultúry (2×10^5 buniek na jamku) v médiu EFM a inkubujú sa 24 hodín, aby sa umožnilo prichytenie buniek k platničke. Médium EFM sa odstráni a nahradí sa testovanými a referenčnými chemikáliami v médiu EFM a pokračuje inkubácia v trvaní 19 – 24 hodín. Osobitné faktory je potrebné zohľadniť v prípade látok s vysokou mierou prchavosti, pretože sa môžu v blízkych jamkách s kontrolami prejaviť falošne pozitívne výsledky. V takýchto prípadoch môže použitie hermetických uzáverov platničiek prispieť k účinnému izolovaniu jednotlivých jamiek počas testovania, a preto sa odporúča.

Testy na zistenie rozsahu

27. Pri testovaní na zistenie rozsahu sa používajú všetky jamky 96-jamkovej mikrotitračnej platničky, aby bolo možné testovať až šesť testovaných chemikálií prostredníctvom sedembodových sériových riedení v pomere 1:10 uskutočnených dvojmo (pozri obrázky 1 a 2).

— Pri testovaní *agonistu* na zistenie rozsahu sa používajú štyri koncentrácie E2 dvojmo ako referenčný štandard a štyri jamky s replikátmi na kontrolu s DMSO.

— Pri testovaní *antagonistu* na zistenie rozsahu sa používajú tri koncentrácie Ral/E2 s $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 dvojmo ako referenčný štandard, s tromi jamkami s replikátmi na kontroly s E2 a s DMSO.

Obrázok 1

Rozloženie pri teste agonistu na zistenie rozsahu na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke

	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

Skratky: E2-1 až E2-4 = koncentrácie referenčného štandardu E2 (od vysokej po nízku); TC1-1 až TC1-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 1 (TC1); TC2-1 až TC2-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 2 (TC2); TC3-1 až TC3-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 3 (TC3); TC4-1 až TC4-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 4 (TC4); TC5-1 až TC5-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 5 (TC5); TC6-1 až TC6-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 6 (TC6); VC = kontrola s nosičom [DMSO (1 obj. % EFM)].

▼M8

Obrázok 2

Rozloženie pri teste antagonistu na zistenie rozsahu na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke

	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

Skratky: E2 = kontrola s E2; Ral-1 až Ral-3 = koncentrácie referenčného štandardu s raloxifén/E2 (od vysokej po nízku); TC1-1 až TC1-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 1 (TC1); TC2-1 až TC2-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 2 (TC2); TC3-1 až TC3-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 3 (TC3); TC4-1 až TC4-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 4 (TC4); TC5-1 až TC5-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 5 (TC5); TC6-1 až TC6-7 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 6 (TC6); VC = kontrola s nosičom [DMSO (1 obj. % EFM)].

Poznámka: Všetky testované chemikálie sa testujú za prítomnosti $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2.

28. Odporúčaný konečný objem médií potrebný pre každú jamku je 200 µl. Používajte len testovacie mikrotitračné platničky, v ktorých je vo všetkých jamkách životaschopnosť buniek najmenej 80 %.

29. Stanovenie počiatočných koncentrácií pre komplexné testovanie ***agonistu*** sa podrobne opisuje v protokole testu agonistu (7). Stručne možno uviesť, že sa používajú tieto kritériá:

— Ak sa na krivke koncentrácie testovanej chemikálie nenachádzajú body, ktoré sú vyššie než stredná hodnota plus trojnásobok štandardnej odchýlky kontroly s DMSO, komplexné testovanie sa uskutoční pomocou 11-bodového sériového riedenia v pomere 1:2, ktoré sa začína pri maximálnej rozpustnej koncentrácii.

— Ak sa na krivke koncentrácie testovanej chemikálie nachádzajú body, ktoré sú vyššie než stredná hodnota plus trojnásobok štandardnej odchýlky kontroly s DMSO, počiatočná koncentrácia, ktorá sa má použiť pre 11-bodovú schému riedenia pri komplexnom testovaní, má byť o jeden logaritmický rád vyššia než koncentrácia vykazujúca najvyššiu upravenú hodnotu RLU pri zisťovaní rozsahu. 11-bodová schéma riedenia bude založená na riedeniach v pomere 1:2 alebo 1:5 podľa týchto kritérií:

11-bodové sériové riedenie v pomere 1:2 sa použije, ak výsledný rozsah koncentrácií bude zahŕňať celý rozsah reakcií na základe krivky závislosti reakcie od koncentrácie vytvorenej v rámci testu na zistenie rozsahu. V opačnom prípade sa použije riedenie v pomere 1:5.

▼**M8**

— Ak testovaná chemikália v teste na zistenie rozsahu vykazuje dvojfázovú krivku závislosti reakcie od koncentrácie, pri komplexnom testovaní je potrebné zahrnúť obe fázy.

30. Stanovenie počiatočných koncentrácií pre komplexné testovanie ***antagonistu*** sa podrobne opisuje v protokole testu antagonistu (7). Stručne možno uviesť, že sa používajú tieto kritériá:

— Ak sa na krivke koncentrácie testovanej chemikálie nenachádzajú body, ktoré sú nižšie než stredná hodnota mínus trojnásobok štandardnej odchýlky kontroly s E2, komplexné testovanie sa uskutoční pomocou 11-bodového sériového riedenia v pomere 1:2, ktoré sa začína pri maximálnej rozpustnej koncentrácii.

— Ak sa na krivke koncentrácie testovanej chemikálie nachádzajú body, ktoré sú nižšie než stredná hodnota mínus trojnásobok štandardnej odchýlky kontroly s E2, počiatočná koncentrácia, ktorá sa má použiť pre 11-bodovú schému riedenia pri komplexnom testovaní, má byť jedna z týchto:

• koncentrácia vykazujúca najnižšiu upravenú hodnotu RLU pri zisťovaní rozsahu,

• maximálna rozpustná koncentrácia [pozri protokol testu antagonistu (7), obrázok 14-2],

• najnižšia cytotoxická koncentrácia [pozri protokol testu antagonistu (7), súvisiaci príklad na obrázku 14-3].

— 11-bodová schéma riedenia bude založená buď na sériovom riedení v pomere 1:2 alebo 1:5, alebo na riedení podľa týchto kritérií:

11-bodové sériové riedenie v pomere 1:2 sa použije, ak výsledný rozsah koncentrácií bude zahŕňať celý rozsah reakcií na základe krivky závislosti reakcie od koncentrácie vytvorenej v rámci testu na zistenie rozsahu. V opačnom prípade sa použije riedenie v pomere 1:5.

Komplexné testy

31. Komplexné testovanie sa skladá z 11-bodových sériových riedení (sériové riedenia v pomere 1:2 alebo 1:5 na základe počiatočnej koncentrácie podľa kritérií komplexného testovania), pričom každá koncentrácia sa testuje v troch jamkách na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke (pozri obrázky 3 a 4).

— Pri komplexnom testovaní *agonistu* sa používa 11 koncentrácií E2 dvojmo ako referenčný štandard. Na každej mikrotitračnej platničke sa nachádzajú štyri jamky s replikátmi na kontrolu s DMSO a štyri jamky s replikátmi na kontrolu s metoxychlórom ($9{,}06 \times 10^{-6}$ M).

— Pri komplexnom testovaní *antagonistu* sa používa deväť koncentrácií Ral/E2 s $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 dvojmo ako referenčný štandard, pričom sa použijú štyri jamky s replikátmi na kontrolu s $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2, štyri jamky s replikátmi na kontroly s DMSO a štyri jamky na kontrolu s $3{,}36 \times 10^{-6}$M tamoxifénu.

▼M8

Obrázok 3

Rozloženie pri komplexnom teste agonistu na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke

	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

Skratky: TC1-1 až TC1-11 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 1; TC2-1 až TC2-11 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 2; E2-1 až E2-11 = koncentrácie referenčného štandardu E2 (od vysokej po nízku); Meth = slabá pozitívna kontrola s p,p'-metoxychlórom; VC = kontrola s nosičom – DMSO (1 obj. %) EFM

Obrázok 4

Rozloženie pri komplexnom teste antagonistu na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke

	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

Skratky: E2 = kontrola s E2; Ral-1 až Ral-9 = koncentrácie referenčného štandardu raloxifén/E2 (od vysokej po nízku); Tam = slabá pozitívna kontrola s tamoxifénom/E2; TC1-1 až TC1-11 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 1 (TC1); TC2-1 až TC2-11 = koncentrácie (od vysokej po nízku) testovanej chemikálie 2 (TC2); VC = kontrola s nosičom [DMSO (1 obj. % EFM)].Poznámka: Ako bolo uvedené, všetky referenčné a testovacie jamky obsahujú pevne stanovenú koncentráciu E2 ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M).

32. S cieľom zaručiť nezávislosť sa majú opakované komplexné testy tej istej chemikálie uskutočňovať v rôznych dňoch. Uskutočnia sa najmenej dva komplexné testy. Ak si výsledky týchto testov navzájom odporujú (t. j. jeden test je pozitívny a druhý negatívny) alebo ak je jeden z testov nedostatočný, uskutoční sa dodatočný tretí test.

Meranie luminiscencie

33. Luminiscencia sa meria v rozsahu 300 až 650 nm pomocou vstrekovacieho luminometra a softvéru, ktorý ovláda vstrekový objem a interval merania (7). Emisia svetla z jednotlivých jamiek sa vyjadruje ako počet relatívnych svetelných jednotiek (RLU) na jamku.

▼M8

ANALÝZA ÚDAJOV

Stanovenie EC_{50}/IC_{50}

34. Hodnoty EC_{50} [polovica maximálne účinnej koncentrácie testovanej chemikálie (agonisti)] a IC_{50} [polovica maximálnej inhibičnej koncentrácie testovanej chemikálie (antagonisti)] sa stanovujú z údajov o závislosti reakcie od koncentrácie. V prípade testovaných chemikálií, ktoré sú pozitívne pri jednej alebo viacerých koncentráciách, sa koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá spôsobuje polovicu maximálnej reakcie (IC_{50} alebo EC_{50}), vypočíta na základe analýzy Hillovej funkcie alebo vhodnej alternatívy. Hillova funkcia predstavuje logistický matematický model so štyrmi parametrami, ktorý vyjadruje vzťah medzi koncentráciou testovanej chemikálie a reakciou (zvyčajne vyjadrený sigmoidálnou krivkou) pomocou tejto rovnice:

$$Y = dolný\ bod + \frac{(horný\ bod - dolný\ bod)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)sklon\ krivky\ podľa\ Hillovej\ rovnice}$$

Keď:

Y = reakcia (t. j. počet RLU),

X = logaritmus koncentrácie,

dolný bod = minimálna reakcia,

horný bod = maximálna reakcia,

lg EC_{50} (alebo lg IC_{50}) = logaritmus X ako reakcia medzi horným a dolným bodom,

sklon krivky podľa Hillovej rovnice = strmosť krivky.

Model súži na výpočet najlepšie zodpovedajúcich hodnôt pre parametre horného a dolného bodu, sklonu krivky podľa Hillovej rovnice a IC_{50} a EC_{50}. Na výpočet hodnôt EC_{50} a IC_{50} je potrebné použiť vhodný štatistický softvér (napr. Graphpad Prism^{R}).

Stanovenie odľahlých hodnôt

35. K správnemu štatistickému úsudku môže okrem iného prispieť použitie Q-testu [pozri protokoly testov agonistu a antagonistu (7)] na určenie „nepoužiteľných“ jamiek, ktoré sa vylúčia z analýzy údajov.

36. V prípade replikátov referenčného štandardu E2 (vzorka testovaná dvojmo) sa akákoľvek upravená hodnota RLU pre replikát pri danej koncentrácii E2 považuje za odľahlú hodnotu, ak je jeho hodnota o viac ako 20 % vyššia alebo nižšia než upravená hodnota RLU pre danú koncentráciu v historickej databáze.

Získavanie a úprava údajov luminometra pri testovaní na zistenie rozsahu

37. Nespracované údaje z luminometra sa prenesú do šablóny tabuľky určenej pre túto skúšku. Je potrebné určiť, či existujú údajové body s odľahlými hodnotami, ktoré sa musia odstrániť. (Pozri kritériá prijateľnosti testov, pokiaľ ide o parametre, ktoré sa určujú v analýzach.) Vykonajú sa tieto výpočty:

Agonista

Krok 1 Vypočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom DMSO (VC).

Krok 2 Na normalizáciu údajov odpočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom DMSO od hodnoty jednotlivých jamiek.

▼**M8**

Krok 3 Vypočítajte strednú násobnú indukciu pre referenčný štandard (E2).

Krok 4 Vypočítajte strednú hodnotu EC_{50} pre testované chemikálie.

Antagonista

Krok 1 Vypočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom DMSO.

Krok 2 Na normalizáciu údajov odpočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom DMSO od hodnoty jednotlivých jamiek.

Krok 3 Vypočítajte strednú násobnú redukciu pre referenčný štandard (Ral/E2).

Krok 4 Vypočítajte strednú hodnotu pre referenčný štandard E2.

Krok 5 Vypočítajte strednú hodnotu IC_{50} pre testované chemikálie.

Získavanie a úprava údajov luminometra pri komplexnom testovaní

38. Nespracované údaje z luminometra sa prenesú do šablóny tabuľky určenej pre túto skúšku. Je potrebné určiť, či existujú údajové body s odľahlými hodnotami, ktoré sa musia odstrániť. (Pozri kritériá prijateľnosti testov, pokiaľ ide o parametre, ktoré sa určujú v analýzach.) Vykonajú sa tieto výpočty:

Agonista

Krok 1 Vypočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom DMSO.

Krok 2 Na normalizáciu údajov odpočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom DMSO od hodnoty jednotlivých jamiek.

Krok 3 Vypočítajte strednú násobnú indukciu pre referenčný štandard (E2).

Krok 4 Vypočítajte strednú hodnotu EC_{50} pre E2 a testované chemikálie.

Krok 5 Vypočítajte strednú upravenú hodnotu RLU pre metoxychlór.

Antagonista

Krok 1 Vypočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom DMSO.

Krok 2 Na normalizáciu údajov odpočítajte strednú hodnotu kontroly s nosičom DMSO od hodnoty jednotlivých jamiek.

Krok 3 Vypočítajte strednú násobnú indukciu pre referenčný štandard (Ral/E2).

Krok 4 Vypočítajte strednú hodnotu IC_{50} pre Ral/E2 a testované chemikálie.

Krok 5 Vypočítajte strednú upravenú hodnotu RLU pre tamoxifén.

Krok 6 Vypočítajte strednú hodnotu pre referenčný štandard E2.

▼M8

Kritériá na interpretáciu údajov

39. Skúška VM7Luc ER TA má tvoriť súčasť prístupu založeného na analýze váhy dôkazov na stanovenie priority pre látky na testovanie narušenia endokrinného systému (ED) *in vivo*. Súčasťou tohto postupu na stanovenie priorít bude klasifikácia testovanej chemikálie ako pozitívnej alebo negatívnej, pokiaľ ide o agonistické alebo antagonistické pôsobenie na ER. Kritériá na rozhodnutie o klasifikácii látky ako pozitívnej alebo negatívnej, ktoré sa použili vo validačnej štúdii VM7Luc ER TA, sú opísané v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Kritériá na rozhodnutie o klasifikácii látky ako pozitívnej alebo negatívnej

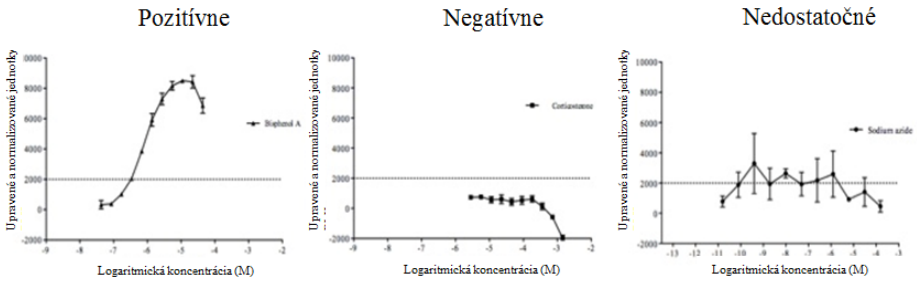
AGONISTICKÉ PÔSOBENIE	
Pozitívne výsledky	— Všetky testované chemikálie klasifikované ako *pozitívne* z hľadiska agonistického pôsobenia na ER majú mať krivku závislosti reakcie od koncentrácie, ktorá obsahuje základnú líniu, za ktorou nasleduje časť s pozitívnym sklonom a na záver rovnovážna časť alebo vrchol. V niektorých prípadoch môžu byť vymedzené len dve z týchto charakteristík (základná línia – sklon alebo sklon – vrchol). — Línia, ktorá vymedzuje pozitívny sklon, má obsahovať najmenej tri body s neprekrývajúcimi sa pásmami odchýlky (stredná hodnota ± SD). Vylúčené sú body, ktoré tvoria základnú líniu, lineárna časť krivky však môže zahŕňať vrchol alebo prvý bod rovnovážnej časti. — Na pozitívnu klasifikáciu sa vyžaduje amplitúda reakcie, t. j. rozdiel medzi základnou líniou a vrcholom, najmenej 20 % maximálnej hodnoty v prípade referenčného štandardu E2 [t. j. najmenej 2 000 RLU, ak je maximálna hodnota reakcie referenčného štandardu (E2) upravená na 10 000 RLU]. — Ak je to možné, hodnota EC_{50} sa má vypočítať pre každú pozitívnu testovanú chemikáliu.
Negatívne výsledky	Priemerná upravená hodnota RLU pre príslušnú koncentráciu je na úrovni alebo pod úrovňou strednej hodnoty RLU kontroly s DMSO plus trojnásobku štandardnej odchýlky hodnoty RLU pre DMSO.
Nedostatočné výsledky	Údaje, ktoré vzhľadom na významné kvalitatívne alebo kvantitatívne obmedzenia nemožno interpretovať ako platné na preukázanie prítomnosti alebo neprítomnosti daného pôsobenia, sa považujú za nedostatočné a nemožno na ich základe stanoviť, či je testovaná chemikália pozitívna alebo negatívna. Test chemikálií je potrebné zopakovať.
ANTAGONISTICKÉ PÔSOBENIE	
Pozitívne výsledky	— Údaje o testovanej chemikálii vytvárajú krivku závislosti reakcie od koncentrácie, ktorá obsahuje základnú líniu, za ktorou nasleduje časť s negatívnym sklonom. — Línia, ktorá vymedzuje negatívny sklon, má obsahovať najmenej tri body s neprekrývajúcimi sa pásmami odchýlky. Vylúčené sú body, ktoré tvoria základnú líniu, lineárna časť krivky však môže zahŕňať prvý bod rovnovážnej časti. — Existovať má najmenej 20 % redukcia pôsobenia v porovnaní s maximálnou hodnotou pre referenčný štandard Ral/E2 [t. j. 8 000 RLU alebo menej, ak je maximálna hodnota reakcie referenčného štandardu (Ral/E2) upravená na 10 000 RLU]. — Najvyššie koncentrácie testovanej chemikálie, ktoré nie sú cytotoxické, majú byť menšie alebo rovné 1×10^{-5} M. — Ak je to možné, hodnota IC_{50} sa má vypočítať pre každú pozitívnu testovanú chemikáliu.
Negatívne výsledky	Všetky údajové body sa nachádzajú nad hodnotou EC_{80} (80 % reakcie E2 alebo 8 000 RLU) pri koncentráciách nižších ako $1{,}0 \times 10^{-5}$ M.
Nedostatočné výsledky	Údaje, ktoré vzhľadom na významné kvalitatívne alebo kvantitatívne obmedzenia nemožno interpretovať ako platné na preukázanie prítomnosti alebo neprítomnosti daného pôsobenia, sa považujú za nedostatočné a nemožno na ich základe stanoviť, či je testovaná chemikália pozitívna alebo negatívna. Je potrebné zopakovať testovanie chemikálie.

▼M8

40. Pozitívne výsledky bude podľa možnosti charakterizovať rozsah účinku a koncentrácia, pri ktorej k účinku dochádza. Príklady pozitívnych, negatívnych a nedostatočných údajov sa uvádzajú na obrázkoch 5 a 6.

Obrázok 5

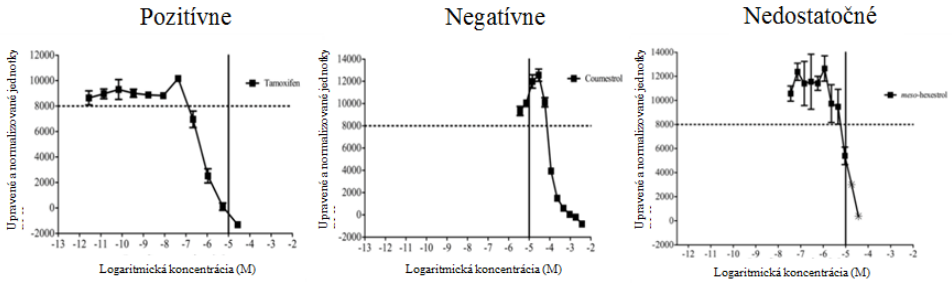
Príklady agonistu: pozitívne, negatívne a nedostatočné údaje



Prerušovaná čiara označuje 20 % reakcie E2, 2 000 upravených a normalizovaných jednotiek RLU.

Obrázok 6

Príklady antagonistu: pozitívne, negatívne a nedostatočné údaje



Prerušovaná čiara označuje 80 % reakcie Ral/E2, 8 000 upravených a normalizovaných jednotiek RLU.

Plná čiara označuje hodnotu 1,00 x 10^{-5} M. Na to, aby sa reakcia považovala za pozitívnu, musí byť pod úrovňou línie 8 000 RLU a pri koncentráciách nižších ako 1,00 x 10^{-5} M.

Koncentrácie označené hviezdičkou na grafe pre mezo-hexestrol označujú stupeň životaschopnosti „2“ alebo vyšší.

Výsledky testov pre mezo-hexestrol sa považujú za nedostatočné údaje, pretože k jedinej reakcii, ktorá je pod úrovňou 8 000 RLU, dochádza pri koncentrácii 1,00 x 10^{-5} M.

41. Výpočty EC_{50} a IC_{50} možno uskutočniť pomocou Hillovej funkcie so štyrmi parametrami [pozri ďalšie podrobnosti v protokole testu agonistu a protokole testu antagonistu (7)]. Splnenie kritérií prijateľnosti naznačuje, že systém funguje správne, nie je však zabezpečené, že z ktoréhokoľvek konkrétneho testovacieho cyklu vyplynú presné údaje. Duplikovanie výsledkov prvého testovacieho cyklu je najlepším potvrdením toho, že boli generované presné údaje (pozri odsek 19 v časti ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER).

▼**M8**

SPRÁVA O TESTE

42. Pozri odsek 20 v časti ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER.

LITERATÚRA

(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): 5 367-5 373.

(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): s. 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: s. 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): 1 459 – 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): 4 252 – 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**

Dodatok 4

SKÚŠKA NA ZÁKLADE TRANSAKTIVÁCIE STABILNE TRANSFEKTOVANÉHO ĽUDSKÉHO ESTROGÉNOVÉHO RECEPTORA A NA URČENIE ESTROGÉNOVÉHO AGONISTICKÉHO A ANTAGONISTICKÉHO PÔSOBENIA CHEMIKÁLIÍ POMOCOU BUNKOVEJ LÍNIE ERA CALUX

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA (POZRI AJ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Pri tejto skúške transaktivácie ERα CALUX sa využíva ľudská bunková línia U2OS na stanovenie estrogénového agonistického a antagonistického pôsobenia sprostredkovaného ľudským estrogénovým receptorom alfa (hERα). Na základe validačnej štúdie stabilne transfektovanej biologickej analýzy ERα CALUX uskutočnenej spoločnosťou BioDetection Systems BV (Amsterdam, Holandsko) sa preukázala relevantnosť a spoľahlivosť tejto skúšky na zamýšľaný účel (1). Pri bunkovej línii ERα CALUX dochádza len k expresii stabilne transfektovaného ľudského estrogénového receptora ERα (2) (3).

2. Táto skúška je osobitne navrhnutá na detekciu transaktivácie sprostredkovanej receptorom hERα, pričom ako sledovaný parameter sa meria bioluminiscencia. Bioluminiscencia sa bežne využíva v biologických analýzach vzhľadom na vysoký pomer signál-šum (4).

3. Uvádza sa, že pri koncentráciách fytoestrogénu vyšších ako 1 μM dochádza k nadmernej aktivácii reportérového génu luciferázy, čo vedie k luminiscencii, ktorá nie je sprostredkovaná receptorom (5) (6) (7). Pri skúškach stabilne transfektovanej transaktivácie ER je preto potrebné dôkladne preskúmať vyššie koncentrácie fytoestrogénov alebo iných podobných zlúčenín, ktoré môžu spôsobiť nadmernú aktiváciu expresie luciferázy (pozri dodatok 2).

4. Pred použitím tejto skúšky na regulačné účely je potrebné prečítať si časti VŠEOBECNÝ ÚVOD a ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER. Vymedzenie pojmov a skratky použité v tejto testovacej metóde sú uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP SKÚŠKY (POZRI AJ ČASŤ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

5. Táto biologická analýza slúži na posúdenie naviazania ligandu ER a následného premiestnenia komplexu receptora a ligandu do jadra. V jadre sa komplex receptora a ligandu naviaže na konkrétne úseky DNA zodpovedné za reakciu a transaktivuje reportérový gén luciferázy svetlušky svätojánskej, čo vedie k zvýšenej bunkovej expresii enzýmu luciferázy. Po pridaní luciferázového substrátu luciferínu sa luciferín transformujte na bioluminiscenčný produkt. Svetlo, ktoré vzniká, možno jednoducho detegovať a kvantifikovať pomocou luminometra.

6. V testovacom systéme sa využívajú stabilne transfektované bunky ERα CALUX. Bunky ERα CALUX pochádzajú z bunkovej línie U2OS osteoblastického osteosarkómu. Ľudské bunky U2OS boli stabilne transfektované s 3xHRE-TATA-Luc a pSG5-neo-hERα pomocou metódy založenej na súčasnom vyzrážaní fosforečnanu vápenatého. Bunková línia U2OS bola zvolená ako najvhodnejší kandidát, aby slúžila ako reportérová bunková línia reagujúca na estrogén (a iné steroidné hormóny), a to na základe pozorovania, že bunková línia U2OS vykazuje len malú alebo nevykazuje žiadnu aktivitu endogénnych receptorov. Neprítomnosť endogénnych receptorov sa posudzovala len pomocou reportérových plazmidov luciferázy, pričom sa pri pridaní ligandov receptora neprejavila žiadna aktivita. Okrem toho táto bunková línia podporovala silné reakcie sprostredkované hormónmi, keď sa prechodne zaviedli príbuzné receptory (2) (3) (8).

7. Súčasťou testovania estrogénového alebo antiestrogénového pôsobenia chemikálií pomocou bunkovej línie ERα CALUX je predbežný testovací cyklus a komplexné testovacie cykly. Počas predbežného testovacieho cyklu sa určuje rozpustnosť, cytotoxicita a upravený rozsah koncentrácií testovaných chemikálií určených na komplexné testovanie. Počas komplexných testovacích cyklov sa upravené rozsahy koncentrácií testovaných

▼M8

chemikálií testujú v rámci biologických analýz ERα CALUX, po ktorých nasleduje klasifikácia testovaných chemikálií z hľadiska agonistického alebo antagonistického účinku.

8. Kritériá na interpretáciu údajov sú podrobne opísané v odseku 59. Testovanú chemikáliu možno stručne charakterizovať ako pozitívnu z hľadiska agonistického účinku v prípade, že aspoň dve po sebe idúce koncentrácie testovanej chemikálie vykazujú reakciu, ktorá sa rovná alebo je vyššia ako 10 % maximálnej reakcie referenčného štandardu 17β-estradiolu (PC_{10}). Testovanú chemikáliu možno charakterizovať ako pozitívnu z hľadiska antagonistického účinku v prípade, že aspoň dve po sebe idúce koncentrácie testovanej chemikálie vykazujú reakciu, ktorá sa rovná alebo je nižšia ako 80 % maximálnej reakcie referenčného štandardu tamoxifénu (PC_{80}).

POSTUP

Bunkové línie

9. Na túto skúšku sa používa stabilne transfektovaná bunková línia U2OS ERα CALUX. Túto bunkovú líniu možno na základe technickej licenčnej zmluvy získať od organizácie BioDetection Systems BV, Amsterdam, Holandsko.

10. Používať sa majú len bunkové kultúry bez prítomnosti mykoplazmy. Použité šarže buniek buď majú mať certifikáciu potvrdzujúcu neprítomnosť kontaminácie mykoplazmou, alebo sa má pred použitím uskutočniť test na mykoplazmu. Na citlivú detekciu mykoplazmatickej infekcie sa má použiť polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase (RT-PCR) (9).

Stabilita bunkovej línie

11. Na zachovanie stability a integrity buniek CALUX sa majú bunky skladovať v tekutom dusíku (–80 °C). Po rozmrazení buniek na začatie kultivácie novej kultúry sa bunky aspoň dvakrát subkultivujú a až potom sa použijú na posúdenie estrogénového agonistického a antagonistického pôsobenia chemikálií. Subkultivácia buniek nemá presiahnuť 30 pasáží.

12. S cieľom monitorovať stabilitu bunkovej línie v priebehu času sa vnímavosť agonistického a antagonistického testovacieho systému overuje na základe hodnotenia hodnôt EC_{50} alebo IC_{50} referenčného štandardu. Okrem toho sa monitoruje relatívna indukcia pozitívnej kontrolnej vzorky (PC) a negatívnej kontrolnej vzorky (NC). Výsledky majú byť v súlade s kritériami prijateľnosti pre agonistickú (tabuľka 3C) alebo antagonistickú (tabuľka 4C) biologickú analýzu ERα CALUX. V tabuľke 1 sa uvádzajú referenčné štandardy, pozitívne a negatívne kontroly pre agonistický režim a v tabuľke 2 pre antagonistický režim.

Bunková kultúra a podmienky očkovania

13. Bunky U2OS sa kultivujú v rastovom médiu [DMEM/F12 (1:1) s fenolovou červeňou ako indikátorom pH, ktoré je doplnené bovinným fetálnym sérom (7,5 %), neesenciálnymi aminokyselinami (1 %), 10 jednotkami/ml penicilínu, streptomycínu a geneticínu (G-418) ako selekčným markerom]. Bunky sa umiestnia do inkubátora s atmosférou s obsahom CO_2 (5 % CO_2) pri teplote 37 °C a 100 % vlhkosti. Keď sa pri bunkách dosiahne konfluencia 85 – 95 %, bunky sa buď subkultivujú, alebo sa pripravia na naočkovanie do 96-jamkových mikrotitračných platničiek. V druhom uvedenom prípade sa bunky resuspendujú v objeme 1×10^5 buniek/ml v skúšobnom médiu bez prítomnosti estrogénu [DMEM/F12 (1:1) bez fenolovej červene, ktoré je doplnené bovinným fetálnym sérom ošetreným uhlím povrchovo upraveným dextránom (5 obj. %), neesenciálnymi aminokyselinami (1 obj. %) a 10 jednotkami/ml penicilínu a streptomycínu] a naočkujú sa do jamiek 96-jamkových mikrotitračných platničiek (100 µl homogenizovanej bunkovej suspenzie). Bunky sa 24 hodín pred expozíciou preinkubujú v inkubátore s atmosférou s obsahom CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100 % vlhkosť). Plastové nádoby musia byť bez prítomnosti estrogénov.

▼M8

Kritériá prijateľnosti

14. Agonistické a antagonistické pôsobenia testovaných chemikálií sa testujú v testovacích sériách. Testovacia séria obsahuje najviac šesť mikrotitračných platničiek. Každá testovacia séria obsahuje najmenej jednu úplnú sériu riedení referenčného štandardu, pozitívnu kontrolnú vzorku, negatívnu kontrolnú vzorku a kontroly s aplikáciou rozpúšťadla. Na obrázkoch 1 a 2 sa uvádza rozloženie na mikrotitračných platničkách pri agonistických a antagonistických testovacích sériách.

15. Každé riedenie referenčných štandardov, testovaných chemikálií, ako aj všetky kontroly s aplikáciou rozpúšťadla a pozitívne a negatívne kontroly sa analyzujú trojmo. Každá z trojnásobných analýz musí spĺňať kritériá uvedené v tabuľke 3A a 4A.

16. Na prvej mikrotitračnej platničke v každej testovacej sérii sa meria úplná séria riedení referenčného štandardu (17β-estradiol pre agonistický účinok; tamoxifén pre antagonistický účinok). Na to, aby bolo možné porovnať výsledky analýzy zvyšných 5 mikrotitračných platničiek s prvou mikrotitračnou platničkou, ktorá obsahuje úplnú krivku závislosti reakcie od koncentrácie pre referenčný štandard, musia všetky mikrotitračné platničky obsahovať 3 kontrolné vzorky: kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla, najvyššiu koncentráciu testovaného referenčného štandardu a približnú koncentráciu referenčného štandardu zodpovedajúcu hodnotám EC_{50} (agonistický účinok) alebo IC_{50} (antagonistický účinok). Pomer priemerných kontrolných vzoriek na prvej mikrotitračnej platničke a na zvyšných 5 platničkách má vyhovovať požiadavkám uvedeným v tabuľke 3C (agonistický účinok) alebo tabuľke 4C (antagonistický účinok).

17. Pri každej mikrotitračnej platničke v testovacej sérii sa vypočíta z-faktor (10). Pri výpočte z-faktora sa používajú reakcie na najvyššiu a najnižšiu koncentráciu referenčného štandardu. Mikrotitračná platnička sa považuje za platnú v prípade, že vyhovuje požiadavkám uvedeným v tabuľke 3C (agonistický účinok) alebo tabuľke 4C (antagonistický účinok).

18. Referenčný štandard má vykazovať sigmoidálnu krivku závislosti odozvy od dávky. Hodnota EC_{50} alebo IC_{50} odvodená z reakcie série riedení referenčného štandardu má vyhovovať požiadavkám uvedeným v tabuľke 3C (agonistický účinok) alebo tabuľke 4C (antagonistický účinok).

19. Súčasťou každej testovacej série je pozitívna a negatívna kontrolná vzorka. Vypočítaná relatívna indukcia pozitívnej aj negatívnej kontrolnej vzorky má vyhovovať požiadavkám uvedeným v tabuľke 3C (agonistický účinok) alebo tabuľke 4C (antagonistický účinok).

20. Pri všetkých meraniach sa indukčný faktor najvyššej koncentrácie referenčného štandardu meria tak, že sa priemerná hodnota relatívnej svetelnej jednotky (RLU) reakcie pri najvyššej koncentrácii referenčného štandardu 17β-estradiolu vydelí priemernou hodnotou RLU reakcie referenčnej kontroly s aplikáciou rozpúšťadla. Pri tomto indukčnom faktore majú byť splnené minimálne požiadavky z hľadiska násobnej indukcie, ktoré sa uvádzajú v tabuľke 3C (agonistický účinok) alebo tabuľke 4C (antagonistický účinok).

21. Len mikrotitračné platničky, ktoré spĺňajú uvedené kritériá prijateľnosti, sa považujú za platné a možno ich použiť na hodnotenie reakcie testovaných chemikálií.

22. Kritériá prijateľnosti sa vzťahujú na predbežné aj komplexné testovacie cykly.

▼M8

Tabuľka 1

Koncentrácie referenčného štandardu, pozitívnej kontroly (PC) a negatívnej kontroly (NC) pre agonistickú biologickú analýzu CALUX

	Látka	Registračné číslo CAS	Testovací rozsah (M)
Referenčný štandard	17β-estradiol	50-28-2.	$1 \times 10^{-13} – 1 \times 10^{-10}$
Pozitívna kontrola (PC)	17α-metyltestosterón	58-18-4	3×10^{-6}
Negatívna kontrola (NC)	kortikosterón	50-22-6	1×10^{-8}

Tabuľka 2

Koncentrácie referenčného štandardu, pozitívnej kontroly (PC) a negatívnej kontroly (NC) pre antagonistickú biologickú analýzu CALUX

	Látka	Registračné číslo CAS	Testovací rozsah (M)
Referenčný štandard	tamoxifén	10540-29-1	$3 \times 10^{-9} – 1 \times 10^{-5}$
Pozitívna kontrola (PC)	4-hydroxytamoxifén	68047-06-3	1×10^{-9}
Negatívna kontrola (NC)	resveratrol	501-36-0	1×10^{-5}

Tabuľka 3

Kritériá prijateľnosti pre agonistickú biologickú analýzu ERα CALUX

A – samostatné vzorky na mikrotitračnej platničke		**Kritérium**
1	Maximálny percentuálny podiel SD trojnásobných jamiek (pre NC, PC, jednotlivé riedenia testovanej chemikálie a referenčného štandardu, okrem C0)	< 15 %
2	Maximálny percentuálny podiel SD trojnásobných jamiek [pre referenčný štandard a kontroly s aplikáciou rozpúšťadla pre testovanú chemikáliu (C0, SC)]	< 30 %
3	Maximálny únik LDH ako miera cytotoxicity.	< 120 %
B – v rámci jednej mikrotitračnej platničky		
4	Pomer kontroly s aplikáciou rozpúšťadla pre referenčný štandard (C0; platnička 1) a kontroly s aplikáciou rozpúšťadla pre testovanú chemikáliu (SC; platničky 2 až x)	0,5 až 2,0
5	Pomer aprox. hodnoty EC_{50} a najvyšších koncentrácií referenčného štandardu na platničke 1 a aprox. hodnoty EC_{50} a najvyšších koncentrácií referenčného štandardu na platničkách 2 až x (C4, C8)	0,70 až 1,30
6	Z-faktor pre jednotlivé platničky	> 0,6
C – v rámci jednej série analýz (všetky mikrotitračné platničky v rámci jednej série)		
7	Sigmoidálna krivka referenčného štandardu	áno (17ß-estradiol)
8	Rozsah EC_{50} referenčného štandardu 17ß-estradiolu	$4 \times 10^{-12} – 4 \times 10^{-11}$ M
9	Minimálna násobná indukcia najvyššej koncentrácie 17ß-estradiolu vzhľadom na kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla pre referenčný štandard.	5
10	Relatívna indukcia (%) PC.	> 30 %
11	Relatívna indukcia (%) NC	< 10 %

▼M8

Aprox.: aproximatívna; PC: pozitívna kontrola; NC: negatívna kontrola; SC: kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre testovanú chemikáliu; C0: kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre referenčný štandard; SD: štandardná odchýlka; LDH: laktátdehydrogenáza

Tabuľka 4

Kritériá prijateľnosti pre antagonistickú biologickú analýzu ERα CALUX

A – samostatné vzorky na mikrotitračnej platničke		**Kritérium**
1	Maximálny percentuálny podiel SD trojnásobných jamiek [pre NC, PC, jednotlivé riedenia testovanej chemikálie a referenčného štandardu, kontrola s aplikáciou rozpúšťadla (C0)]	< 15 %
2	Maximálny percentuálny podiel SD trojnásobných jamiek [pre kontrolu s nosičom (VC) a najvyššiu koncentráciu referenčného štandardu (C8)]	< 30 %
3	Maximálny únik LDH ako miera cytotoxicity.	< 120 %
B – v rámci jednej mikrotitračnej platničky		
4	Pomer kontroly s aplikáciou rozpúšťadla pre referenčný štandard (C0; platnička 1) a kontroly s aplikáciou rozpúšťadla pre testovanú chemikáliu (SC; platničky 2 až x)	0,70 až 1,30
5	Pomer aprox. koncentrácií IC_{50} referenčného štandardu na platničke 1 a aprox. koncentrácií IC_{50} referenčného štandardu na platničkách 2 až x (C4)	0,70 až 1,30
6	Pomer najvyšších koncentrácií referenčného štandardu na platničke 1 a najvyšších koncentrácií referenčného štandardu na platničkách 2 až x (C8)	0,50 až 2,0
7	Z-faktor pre jednotlivé platničky	> 0,6
C – v rámci jednej série analýz (všetky mikrotitračné platničky v rámci jednej série)		
8	Sigmoidálna krivka referenčného štandardu	áno (tamoxifén)
9	Rozsah IC_{50} referenčného štandardu (tamoxifén)	$1 \times 10^{-8} – 1 \times 10^{-7}$ M
10	Minimálna násobná indukcia kontroly s aplikáciou rozpúšťadla pre referenčný štandard vzhľadom na najvyššiu koncentráciu tamoxifénu.	2,5
11	Relatívna indukcia (%) PC.	< 70 %
12	Relatívna indukcia (%) NC	> 85 %

Aprox.: aproximatívna; PC: pozitívna kontrola; NC: negatívna kontrola; VC: kontrola s nosičom (kontrola s aplikáciou rozpúšťadla bez pevne stanovenej koncentrácie agonistického referenčného štandardu); SC: kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre testovanú chemikáliu; C0: kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre referenčný štandard; SD: štandardná odchýlka; LDH: laktátdehydrogenáza

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom, referenčné štandardy, pozitívne kontroly, negatívne kontroly

23. Pre predbežný testovací cyklus aj pre komplexné testovacie cykly sa má použiť rovnaká kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom, referenčné štandardy, pozitívne kontroly a negatívne kontroly. Okrem toho má byť rovnaká aj koncentrácia referenčných štandardov, pozitívnych kontrol a negatívnych kontrol.

▼M8

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla

24. Rozpúšťadlo, ktoré slúži na rozpustenie testovanej chemikálie, sa má testovať ako kontrola s aplikáciou rozpúšťadla. Počas validácie biologickej analýzy ERα CALUX sa ako nosič použil dimetylsulfoxid (DMSO, 1 obj. %; registračné číslo CAS 67-68-5). Ak sa použije iné rozpúšťadlo ako DMSO, všetky referenčné štandardy, kontroly a testované chemikálie sa majú testovať s rovnakým nosičom. Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre antagonistické štúdie obsahuje pevne stanovenú koncentráciu agonistického referenčného štandardu, ktorým je 17β-estradiol (približne v koncentrácii EC_{50}). S cieľom testovať rozpúšťadlo pre antagonistické štúdie je potrebné pripraviť a testovať kontrolu s nosičom.

Kontrola s nosičom (antagonistický účinok)

25. Na testovanie antagonistického účinku sa do média skúšky dopĺňa pevne stanovená koncentrácia agonistického referenčného štandardu, ktorým je 17β-estradiol (približne v koncentrácii EC_{50}). Na testovanie rozpúšťadla, ktoré slúži na rozpustenie testovaných chemikálií pri skúmaní antagonistického účinku, sa pripraví médium skúšky bez pevne stanovenej koncentrácie agonistického referenčného štandardu 17β-estradiolu. Táto kontrolná vzorka sa označí ako kontrola s nosičom. Počas validácie biologickej analýzy ERα CALUX sa ako nosič použil dimetylsulfoxid (DMSO, 1 obj. %; registračné číslo CAS 67-68-5). Ak sa použije iné rozpúšťadlo ako DMSO, všetky referenčné štandardy, kontroly a testované chemikálie sa majú testovať s rovnakým nosičom.

Referenčné štandardy

26. Agonistický referenčný štandard je 17β-estradiol (tabuľka 1). Referenčný štandard obsahuje sériu riedení ôsmich koncentrácií 17β-estradiolu (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. Antagonistický referenčný štandard je tamoxifén (tabuľka 2). Referenčný štandard obsahuje sériu riedení ôsmich koncentrácií tamoxifénu (3×10^{-9}, 1×10^{-8}, 3×10^{-8}, 1×10^{-7}, 3×10^{-7}, 1×10^{-6}, 3×10^{-6}, 1×10^{-5} M). Každá z koncentrácií antagonistického referenčného štandardu sa inkubuje spolu s pevne stanovenou koncentráciou agonistického referenčného štandardu 17β-estradiolu (3×10^{-12} M).

Pozitívna kontrola

28. Pozitívna kontrola pre agonistické štúdie je 17α-metyltestosterón (tabuľka 1).

29. Pozitívna kontrola pre antagonistické štúdie je 4-hydroxytamoxifén (tabuľka 2). Antagonistická pozitívna kontrola sa inkubuje spolu s pevne stanovenou koncentráciou agonistického referenčného štandardu 17β-estradiolu (3×10^{-12} M).

Negatívna kontrola

30. Negatívna kontrola pre agonistické štúdie je kortikosterón (tabuľka 1).

31. Negatívna kontrola pre antagonistické štúdie je resveratrol (tabuľka 2). Antagonistická negatívna kontrola sa inkubuje spolu s pevne stanovenou koncentráciou agonistického referenčného štandardu 17β-estradiolu (3×10^{-12} M).

▼M8

Preukazovanie spôsobilosti laboratória (pozri odsek 14 a tabuľky 3 a 4 v časti ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER tejto testovacej metódy)

Nosič

32. Rozpúšťadlo, ktoré slúži na rozpustenie testovaných chemikálií, má zabezpečiť úplné rozpustenie testovanej chemikálie a má byť miešateľné s bunkovým médiom. Vhodnými rozpúšťadlami sú DMSO, voda a etanol (s čistotou 95 % až 100 %). V prípade použitia DMSO ako rozpúšťadla nemá maximálna koncentrácia DMSO počas inkubácie prekročiť 1 obj. %. Pred použitím sa má rozpúšťadlo testovať s cieľom overiť, že nie je cytotoxické a nenarušuje výkonnosť skúšok.

Príprava referenčných štandardov, pozitívnych kontrol, negatívnych kontrol a testovaných chemikálií

33. Referenčné štandardy, pozitívne kontroly, negatívne kontroly a testované chemikálie sa rozpustia v 100 % DMSO (alebo vo vhodnom rozpúšťadle). Vhodné (sériové) riedenia sa potom pripravia v tom istom rozpúšťadle. Pred rozpustením sa majú všetky látky nechať ustáliť pri izbovej teplote. V čerstvo pripravených zásobných roztokoch referenčných štandardov, pozitívnych kontrol, negatívnych kontrol a testovaných chemikálií sa nemá vyskytovať viditeľná zrazenina ani zakalenie. Referenčné štandardy a kontroly možno pripraviť vo väčšom množstve do zásoby. Zásobné roztoky testovaných chemikálií sa majú pripraviť čerstvo pred každým pokusom. Konečné riedenia referenčných štandardov, pozitívnych kontrol, negatívnych kontrol a testovaných chemikálií je potrebné pripraviť čerstvo pre každý pokus a použiť do 24 hodín od prípravy.

Rozpustnosť, cytotoxicita a zisťovanie rozsahu.

34. Počas predbežného testovacieho cyklu sa stanoví rozpustnosť testovaných chemikálií vo zvolenom rozpúšťadle. Pripraví sa zásoba s maximálnou koncentráciou 0,1 M. V prípade, že sa pri tejto koncentrácii vyskytnú problémy s rozpustnosťou, pripravia sa zásobné roztoky s nižšou koncentráciou, až kým sa testované chemikálie úplne nerozpustia. Počas predbežného testovacieho cyklu sa testujú sériové riedenia testovanej chemikálie v pomere 1:10. Maximálna koncentrácia skúšky pri testovaní agonistického alebo antagonistického účinku je 1 mM. Po predbežnom testovacom cykle sa odvodí vhodne upravený rozsah koncentrácie testovaných chemikálií, ktorý sa bude testovať počas komplexných testovacích cyklov. Pri komplexnom testovaní sa použijú riedenia 1 x, 3 x, 10 x, 30 x, 100 x, 300 x, 1000 x a 3000 x.

35. Súčasťou protokolu skúšky agonistu a antagonistu je testovanie cytotoxicity (11). Cytotoxicita sa testuje v rámci predbežného testovacieho cyklu aj v rámci komplexných testovacích cyklov. Ako metóda na posúdenie cytotoxicity sa počas validácie biologickej analýzy ERα CALUX použil test úniku laktátdehydrogenázy (LDH) v kombinácii s kvalitatívnou vizuálnou kontrolou buniek (pozri dodatok 4.1) po expozícii testovaným chemikáliám. Použiť však možno aj iné kvantitatívne metódy na stanovenie cytotoxicity (napr. kolorimetrická skúška s využitím tetrazólia (MTT) alebo biologická analýza cytotoxicity CALUX). Vo všeobecnosti sa testované chemikálie, pri ktorých sa prejavuje viac ako 20 % zníženie životaschopnosti buniek, považujú za cytotoxické a nemožno ich preto použiť na vyhodnotenie údajov. Pokiaľ ide o skúšku úniku LDH, koncentrácia testovanej chemikálie sa považuje za cytotoxickú, keď je percentuálna hodnota úniku LDH vyššia ako 120 %.

▼M8

Expozícia testovanej chemikálii a usporiadanie mikrotitračnej platničky pri skúške

36. Po ošetrení banky s konfluentnými kultivovanými bunkami trypsínom sa bunky opätovne rozmiešajú v koncentrácii 1×10^5 buniek/ml v skúšobnom médiu bez prítomnosti estrogénov. Opätovne rozmiešané bunky sa naočkujú po 100 µl do vnútorných jamiek 96-jamkovej mikrotitračnej platničky. Vonkajšie jamky sa naplnia 200 µl fosfátového tlmivého fyziologického roztoku (PBS) (pozri obrázky 1 a 2). Naočkované bunky sa počas 24 hodín preinkubujú v inkubátore s atmosférou s obsahom CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100 % vlhkosť).

37. Po preinkubácii sa mikrotitračné platničky vizuálne skontrolujú z hľadiska cytotoxicity (pozri dodatok 4.1), kontaminácie a konfluencie. Na testovanie sa použijú len mikrotitračné platničky, pri ktorých sa neprejavuje vizuálna cytotoxicita ani kontaminácia a ktoré majú minimálne 85 % mieru konfluencie. Médium z vnútorných jamiek sa opatrne odstráni a nahradí sa 200 µl skúšobného média bez prítomnosti estrogénov, ktoré obsahuje vhodné série riedenia referenčných štandardov, testovaných chemikálií, pozitívnych kontrol, negatívnych kontrol a kontrol s aplikáciou rozpúšťadla (tabuľka 5: agonistické štúdie; tabuľka 6: antagonistické štúdie). Všetky referenčné štandardy, testované chemikálie, pozitívne kontroly, negatívne kontroly a kontroly s aplikáciou rozpúšťadla sa testujú trojmo. Na obrázku 1 sa uvádza rozloženie na mikrotitračnej platničke pri testovaní agonistického účinku. Na obrázku 2 sa uvádza rozloženie na mikrotitračnej platničke pri testovaní antagonistického účinku. Rozloženie na mikrotitračnej platničke pri predbežnom a komplexnom testovaní je identické. Pri testovaní antagonistického účinku obsahujú všetky vnútorné jamky, s výnimkou jamiek obsahujúcich kontrolu s nosičom (VC), aj pevne stanovenú koncentráciu agonistického referenčného štandardu 17β-estradiolu ($3{,}0 \times 10^{-12}$ M). Ku každej platničke TC je potrebné pridať referenčné štandardy C8 a C4.

38. Po expozícii buniek všetkým chemikáliám sa 96-jamkové mikrotitračné platničky inkubujú ďalších 24 hodín v inkubátore s atmosférou s obsahom CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100 % vlhkosť).

Obrázok 1

Rozloženie na 96-jamkových mikrotitračných platničkách na účely predbežného testovacieho cyklu a posúdenia agonistického účinku.

Mikrotitračná platnička 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Ďalšie mikrotitračné platničky

	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 (EC_{50})	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
H												

C0 = rozpúšťadlo pre referenčný štandard.

C(1 – 8) = série riedení (1 – 8, od nízkej po vysokú koncentráciu) referenčného štandardu.

▼M8

PC = pozitívna kontrola.

NC = negatívna kontrola.

TCx-(1 – 8) = riedenia (1 – 8, od nízkej po vysokú koncentráciu) testovanej chemikálie na účely predbežného testovacieho cyklu a posúdenia agonistického účinku testovanej chemikálie x.

SC = kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre testovanú chemikáliu (optimálne rovnaké rozpúšťadlo ako v prípade C0, ale prípadne z inej šarže).

Sivé bunky: = vonkajšie jamky, naplnené 200 µl PBS.

Obrázok 2

Rozloženie na 96-jamkových mikrotitračných platničkách na účely antagonistického predbežného testovacieho cyklu a posúdenia antagonistického účinku.

Mikrotitračná platnička 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Ďalšie mikrotitračné platničky

	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 (IC_{50})	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max.)	
F		C4 (IC_{50})	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max.)	
G		C4 (IC_{50})	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max.)	
H												

C0 = rozpúšťadlo pre referenčný štandard.

C(1 – 8) = série riedení (1 – 8, od nízkej po vysokú koncentráciu) referenčného štandardu.

NC = negatívna kontrola.

PC = pozitívna kontrola.

TCx-(1 – 8) = riedenia (1 – 8, od nízkej po vysokú koncentráciu) testovanej chemikálie na účely predbežného testovacieho cyklu a posúdenia agonistického účinku testovanej chemikálie x.

SC = kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre testovanú chemikáliu (optimálne rovnaké rozpúšťadlo ako v prípade C0, ale prípadne z inej šarže).

VC = kontrola s nosičom (kontrola s aplikáciou rozpúšťadla bez pevne stanovenej koncentrácie agonistického referenčného štandardu 17β-estradiolu).

Sivé bunky: = vonkajšie jamky, naplnené 200 µl PBS.

Poznámka: všetky vnútorné jamky, s výnimkou jamiek obsahujúcich kontrolu s nosičom (VC), obsahujú aj pevne stanovenú koncentráciu agonistického referenčného štandardu 17β-estradiolu ($3{,}0 \times 10^{-12}$ M).

Meranie luminiscencie

39. Meranie luminiscencie sa podrobne opisuje v protokoloch skúšky agonistu a antagonistu (10). Médium z jamiek sa odstráni a bunky sa lýzujú 24 hodín po inkubácii, aby došlo k otvoreniu bunkovej membrány a bolo možné merať aktivitu luciferázy.

▼M8

40. Pri postupe na meranie luminiscencie sa vyžaduje luminometer vybavený dvomi vstrekovačmi. Reakciu luciferázy spúšťa vstreknutie substrátu luciferínu. Reakcia sa zastaví pridaním 0,2 M NaOH. Zastavením reakcie sa predchádza prenosu luminiscencie medzi jednotlivými jamkami.

41. Emitované svetlo z jednotlivých jamiek sa vyjadruje ako počet relatívnych svetelných jednotiek (RLU) na jamku.

Predbežný testovací cyklus

42. Na základe výsledkov analýzy predbežného testovacieho cyklu sa určuje upravený rozsah koncentrácie testovaných chemikálií na komplexné testovanie. Podrobný opis vyhodnotenia výsledkov analýzy predbežného testovacieho cyklu a určenia upraveného rozsahu koncentrácie testovaných chemikálií na komplexné testovanie sa uvádza v protokole skúšky agonistu a antagonistu (10). Na tomto mieste sa uvádza stručné zhrnutie postupov na určenie rozsahu koncentrácie testovaných chemikálií na účely testovania agonistického a antagonistického účinku. Usmernenie k návrhu sériového riedenia sa uvádza v tabuľkách 5 a 6.

Výber koncentrácií na posúdenie agonistických účinkov

43. Počas predbežného testovacieho cyklu sa testované chemikálie majú testovať pomocou sérií riedení, ktoré sa uvádzajú v tabuľke 5 (agonistický účinok) a tabuľke 6 (antagonistický účinok). Všetky koncentrácie sa testujú v trojnásobných jamkách podľa rozloženia mikrotitračnej platničky uvedeného na obrázku 1 (agonistický účinok) alebo obrázku 2 (antagonistický účinok).

44. Len výsledky analýzy, ktoré spĺňajú kritériá prijateľnosti (tabuľka 3), sa považujú za platné a možno ich použiť na hodnotenie reakcie testovaných chemikálií. V prípade, že kritériám prijateľnosti nevyhovie jedna alebo viacero mikrotitračných platničiek, je potrebné vykonať opätovnú analýzu príslušných mikrotitračných platničiek. V prípade, že kritériám prijateľnosti nevyhovie prvá mikrotitračná platnička, ktorá obsahuje úplnú sériu riedení referenčného štandardu, musí sa zopakovať rozbor úplnej testovacej série (6 mikrotitračných platničiek).

45. Upraviť počiatočné rozsahy koncentrácie testovaných chemikálií a zopakovať predbežný testovací cyklus je potrebné v týchto prípadoch:

— Zistí sa cytotoxicita. Postup predbežného testovacieho cyklu sa zopakuje s použitím nižších, necytotoxických koncentrácií testovanej chemikálie.

— Pri predbežnom testovaní testovanej chemikálie sa nedosiahne kompletná krivka závislosti odozvy od dávky, pretože pri testovaných koncentráciách sa dosiahne maximálna indukcia. Predbežný testovací cyklus sa zopakuje s použitím nižších koncentrácií testovanej chemikálie.

46. Keď sa pozoruje platný vzťah dávky a účinku, vyberie sa (najnižšia) koncentrácia, pri ktorej sa pozoruje maximálna indukcia a pri ktorej sa neprejavuje cytotoxicita. Najvyššia koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá sa bude testovať pri komplexných testovacích cykloch, má predstavovať trojnásobok tejto vybratej koncentrácie.

47. Pripraví sa úplná upravená séria riedení testovanej chemikálie s krokmi riedenia uvedenými v tabuľke 5, pričom sa začína s najvyššou koncentráciou určenou vyššie.

▼M8

48. Testovaná chemikália, ktorá nevyvoláva agonistický účinok, sa testuje v rámci komplexných testovacích cyklov, pričom sa začína od najvyššej necytotoxickej koncentrácie zistenej počas predbežného testovania.

Výber koncentrácií na posúdenie antagonistických účinkov

49. Len výsledky analýzy, ktoré spĺňajú kritériá prijateľnosti (tabuľka 4), sa považujú za platné a možno ich použiť na hodnotenie reakcie testovaných chemikálií. V prípade, že kritériám prijateľnosti nevyhovie jedna alebo viacero mikrotitračných platničiek, je potrebné vykonať opätovnú analýzu príslušných mikrotitračných platničiek. V prípade, že kritériám prijateľnosti nevyhovie prvá mikrotitračná platnička, ktorá obsahuje úplnú sériu riedení referenčného štandardu, musí sa zopakovať rozbor úplnej testovacej série (6 mikrotitračných platničiek).

50. Upraviť počiatočné rozsahy koncentrácie testovaných chemikálií a zopakovať predbežný testovací cyklus je potrebné v týchto prípadoch:

— Zistí sa cytotoxicita. Postup predbežného testovacieho cyklu sa zopakuje s použitím nižších, necytotoxických koncentrácií testovanej chemikálie.

— Pri predbežnom testovaní testovanej chemikálie sa nedosiahne kompletná krivka závislosti odozvy od dávky, pretože pri testovaných koncentráciách sa dosiahne maximálna inhibícia. Predbežné testovanie sa zopakuje s použitím nižších koncentrácií testovanej chemikálie.

51. Keď sa zistí platný vzťah dávky a účinku, vyberie sa (najnižšia) koncentrácia, pri ktorej sa pozoruje maximálna inhibícia a pri ktorej sa neprejavuje cytotoxicita. Najvyššia koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá sa bude testovať pri komplexných testovacích cykloch, má predstavovať trojnásobok tejto vybratej koncentrácie.

52. Pripraví sa úplná upravená séria riedení testovanej chemikálie s krokmi riedenia uvedenými v tabuľke 6, pričom sa začína s najvyššou koncentráciou určenou vyššie.

53. Testované chemikálie, ktoré nevyvolávajú antagonistické účinky, sa testujú v rámci komplexných testovacích cyklov, pričom sa začína od najvyššej necytotoxickej koncentrácie testovanej počas predbežného testovania.

Komplexné testovacie cykly

54. Po výbere upravených rozsahov koncentrácie sa testované chemikálie komplexne testujú pomocou sérií riedení, ktoré sa uvádzajú v tabuľke 5 (agonistický účinok) a tabuľke 6 (antagonistický účinok). Všetky koncentrácie sa testujú v trojnásobných jamkách podľa rozloženia mikrotitračnej platničky uvedeného na obrázku 1 (agonistický účinok) alebo obrázku 2 (antagonistický účinok).

55. Len výsledky analýzy, ktoré spĺňajú kritériá prijateľnosti (tabuľky 3 a 4), sa považujú za platné a možno ich použiť na hodnotenie reakcie testovaných chemikálií. V prípade, že kritériám prijateľnosti nevyhovie jedna alebo viacero mikrotitračných platničiek, je potrebné vykonať opätovnú analýzu príslušných mikrotitračných platničiek. V prípade, že kritériám prijateľnosti nevyhovie prvá mikrotitračná platnička, ktorá obsahuje úplnú sériu riedení referenčného štandardu, musí sa zopakovať rozbor úplnej testovacej série (6 mikrotitračných platničiek).

▼M8

Tabuľka 5

Koncentrácie a riedenia referenčných štandardov, kontrol a testovaných chemikálií použité na účely testovania agonistického účinku

Koncentrácia referenčného		TCx – riedenie v predbežnom		TCx – riedenie v komplexnom		Koncentrácia	
17β-estradiolu (M)		testovacom cykle		testovacom cykle		17β-estradiolu (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	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	1×10^{-12}	TCx-4	10 000 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 –testovaná chemikália x
PC –pozitívna kontrola (17α-metyltestosterón)
NC –negatívna kontrola (kortikosterón)
C0 –kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre referenčný štandard
SC –kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre testovanú chemikáliu

▼M8

Tabuľka 6

Koncentrácie a riedenia referenčných štandardov, kontrol a testovaných chemikálií použité na účely testovania antagonistického účinku

Koncentrácia referenčného tamoxifénu (M)		TCx – riedenie v predbežnom testovacom cykle		TCx – riedenie v komplexnom testovacom cykle		Koncentrácia kontrol (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	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	3×10^{-8}	TCx-4	10 000 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	**Koncentrácia doplneného**	
C6	1×10^{-6}	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**agonistu (M)**	
C7	3×10^{-6}	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-estradiol	3×10^{-12}
C8	1×10^{-5}						

TCx –testovaná chemikália x

PC –pozitívna kontrola (4-hydroxytamoxifén)

NC –negatívna kontrola (resveratrol)

C0 –kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre referenčný štandard

SC –kontrola s aplikáciou rozpúšťadla pre testovanú chemikáliuVC –kontrola s nosičom [neobsahuje pevne stanovenú koncentráciu agonistického referenčného štandardu 17β-estradiolu ($3{,}0 \times 10^{-12}$ M)]

▼M8

Zhromažďovanie a analýza údajov

56. Po predbežnom a komplexnom testovacom cykle sa na účely testovania agonistického účinku určia hodnoty EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50} a maximálna indukcia (TCx_{max}) testovanej chemikálie. Pri testovaní antagonistického účinku sa vypočítajú hodnoty IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} a minimálna indukcia (TCx_{min}). Na obrázku 3 (agonistický účinok) a obrázku 4 (antagonistický účinok) je uvedené grafické znázornenie týchto parametrov. Požadované parametre sa vypočítajú na základe relatívnej indukcie jednotlivých testovaných chemikálií [vzhľadom na maximálnu indukciu referenčného štandardu (= 100 %)]. Na vyhodnotenie údajov sa používa nelineárna regresia (variabilný sklon, 4 parametre) podľa tejto rovnice:

$$Y = dolný\ bod + \frac{(horný\ bod - dolný\ bod)}{(1 + 10^{(lgEC_{50} - X) \times sklon\ krivky\ podľa\ Hillovej\ rovnice})}$$

Keď:

X = logaritmus dávky alebo koncentrácie

Y = reakcia [relatívna indukcia (%)]

horný bod = maximálna indukcia (%)

dolný bod = minimálna indukcia (%)

$LogEC_{50}$ = logaritmus koncentrácie, pri ktorej sa pozoruje 50 % maximálnej reakcie

sklon krivky podľa Hillovej rovnice = faktor sklonu krivky alebo podľa Hillovej rovnice

57. Nespracované údaje z luminometra, vyjadrené ako relatívne svetelné jednotky (RLU), sa prenesú do tabuľky na analýzu údajov určenej pre predbežný a komplexný testovací cyklus. Nespracované údaje majú spĺňať kritériá prijateľnosti uvedené v tabuľkách 3A a 3B (agonistický účinok) alebo 4A a 4B (antagonistický účinok). V prípade, že nespracované údaje spĺňajú kritériá prijateľnosti, na určenie požadovaných parametrov sa uskutočnia tieto výpočtové kroky:

Agonistický účinok

— Odpočítajte priemernú hodnotu RLU kontroly s aplikáciou rozpúšťadla pre referenčný štandard od jednotlivých nespracovaných údajov analýzy referenčných štandardov.

— Odpočítajte priemernú hodnotu RLU kontroly s aplikáciou rozpúšťadla pre testovanú chemikáliu od jednotlivých nespracovaných údajov analýzy testovaných chemikálií.

— Vypočítajte relatívnu indukciu jednotlivých koncentrácií referenčného štandardu. Pre indukciu najvyššej koncentrácie referenčného štandardu stanovte hodnotu 100 %.

— Vypočítajte relatívnu indukciu jednotlivých koncentrácií testovanej chemikálie v porovnaní s najvyššou koncentráciou referenčného štandardu, ktorej zodpovedá hodnota 100 %.

— Vyhodnoťte výsledky analýzy pomocou nelineárnej regresie (variabilný sklon, 4 parametre).

▼**M8**

— Stanovte hodnoty EC_{50} a EC_{10} referenčného štandardu.

— Stanovte hodnoty EC_{50} a EC_{10} testovaných chemikálií.

— Stanovte maximálnu relatívnu indukciu testovanej chemikálie (TC_{max}).

— Stanovte hodnoty PC_{10} a PC_{50} testovaných chemikálií.

V prípade testovaných chemikálií nemožno vždy dosiahnuť kompletnú krivku závislosti odozvy od dávky, napríklad v dôsledku cytotoxicity alebo problémov s rozpustnosťou. Hodnoty EC_{50}, EC_{10} a PC_{50} tak nemožno určiť. V takom prípade možno určiť len hodnoty PC_{10} a TC_{max}.

Antagonistický účinok

— Odpočítajte priemernú hodnotu RLU najvyššej koncentrácie referenčného štandardu od jednotlivých nespracovaných údajov analýzy referenčných štandardov.

— Odpočítajte priemernú hodnotu RLU najvyššej koncentrácie referenčného štandardu od jednotlivých nespracovaných údajov analýzy testovaných chemikálií.

— Vypočítajte relatívnu indukciu jednotlivých koncentrácií referenčného štandardu. Pre indukciu najnižšej koncentrácie referenčného štandardu stanovte hodnotu 100 %.

— Vypočítajte relatívnu indukciu jednotlivých koncentrácií testovanej chemikálie v porovnaní s najnižšou koncentráciou referenčného štandardu, ktorej zodpovedá hodnota 100 %.

— Vyhodnoťte výsledky analýzy pomocou nelineárnej regresie (variabilný sklon, 4 parametre).

— Stanovte hodnoty IC_{50} a IC_{20} referenčného štandardu.

— Stanovte hodnoty IC_{50} a IC_{20} testovaných chemikálií.

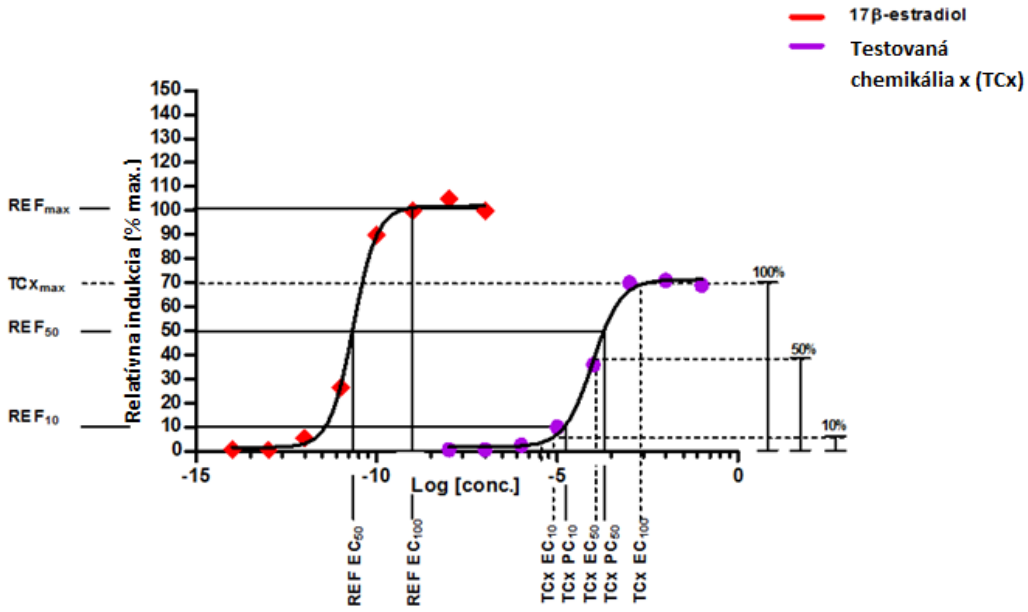
— Stanovte minimálnu relatívnu indukciu testovanej chemikálie (TC_{min}).

— Stanovte hodnoty PC_{80} a PC_{50} testovaných chemikálií.

▼M8

Obrázok 3

Prehľad parametrov určených v skúške agonistu



EC_{10} = koncentrácia látky, pri ktorej sa pozoruje 10 % maximálnej reakcie pri danej látke.

EC_{50} = koncentrácia látky, pri ktorej sa pozoruje 50 % maximálnej reakcie pri danej látke.

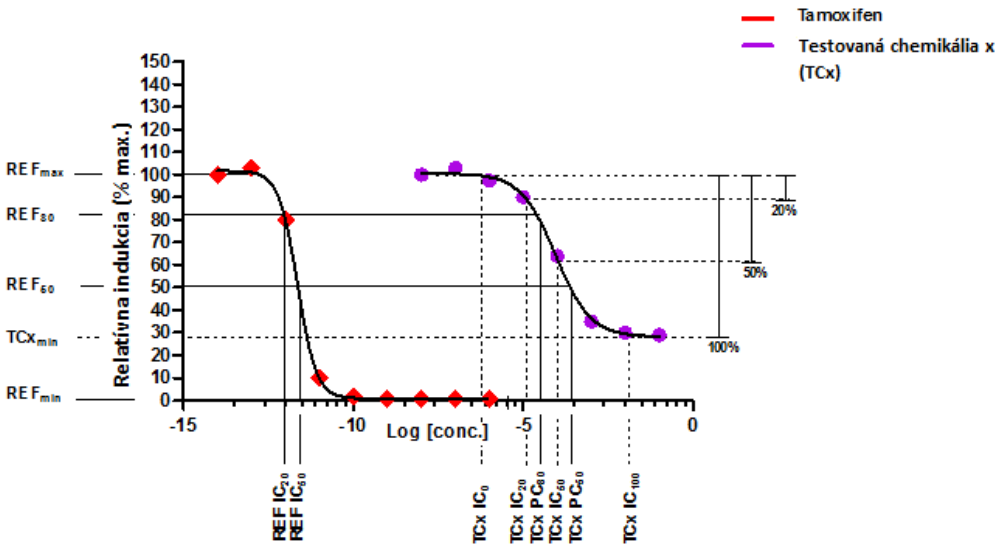
PC_{10} = koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej sa reakcia rovná hodnote EC_{10} referenčného štandardu.

PC_{50} = koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej sa reakcia rovná hodnote EC_{50} referenčného štandardu.

TCx_{max} = maximálna relatívna indukcia testovanej chemikálie.

Obrázok 4

Prehľad parametrov určených v skúške antagonistu



IC_{20} = koncentrácia látky, pri ktorej sa pozoruje 80 % maximálnej reakcie pri danej látke (20 % inhibícia).

▼M8

IC_{50} = koncentrácia látky, pri ktorej sa pozoruje 50 % maximálnej reakcie pri danej látke (50 % inhibícia).

PC_{80} = koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej sa reakcia rovná hodnote IC_{20} referenčného štandardu.

PC_{50} = koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej sa reakcia rovná hodnote IC_{50} referenčného štandardu.

TCx_{min} = minimálna relatívna indukcia testovanej chemikálie.

V prípade testovaných chemikálií nemožno vždy dosiahnuť kompletnú krivku závislosti odozvy od dávky, napríklad v dôsledku cytotoxicity alebo problémov s rozpustnosťou. Hodnoty IC_{50}, IC_{20} a PC_{50} tak nemožno určiť. V takom prípade možno určiť len hodnoty PC_{20} a TC_{min}.

58. Výsledky by mali byť založené na dvoch (alebo troch) nezávislých testovacích cykloch. Ak sa z dvoch testovacích cyklov získajú porovnateľné a tým aj reprodukovateľné výsledky, nie je nevyhnutné uskutočňovať tretí cyklus. Na to, aby boli výsledky prijateľné, musia:

— spĺňať kritériá prijateľnosti (pozri kritériá prijateľnosti v odsekoch 14 – 22),

— byť reprodukovateľné.

Kritériá na interpretáciu údajov

59. Pri interpretácii údajov a rozhodnutí o tom, či sa testovaná chemikália považuje za pozitívnu alebo negatívnu, sa majú použiť tieto kritériá:

Agonistický účinok

Pri každom komplexnom testovacom cykle sa testovaná chemikália považuje za **pozitívnu**, ak:

1. Hodnota TC_{max} sa rovná alebo prekračuje 10 % maximálnej reakcie referenčného štandardu (REF_{10}).

2. Aspoň dve po sebe idúce koncentrácie testovanej chemikálie sa rovnajú hodnote REF_{10} alebo ju prekračujú.

Pri každom komplexnom testovacom cykle sa testovaná chemikália považuje za **negatívnu**, ak:

1. Hodnota TC_{max} neprekračuje 10 % maximálnej reakcie referenčného štandardu (REF_{10}).

2. Menej ako dve koncentrácie testovanej chemikálie sa rovnajú hodnote REF_{10} alebo ju prekračujú.

Antagonistický účinok

Pri každom komplexnom testovacom cykle sa testovaná chemikália považuje za **pozitívnu**, ak:

1. Hodnota TC_{min} sa rovná alebo je nižšia ako 80 % maximálnej reakcie referenčného štandardu (REF_{80} = 20 % inhibícia).

2. Aspoň dve po sebe idúce koncentrácie testovanej chemikálie sa rovnajú hodnote REF_{80} alebo sú nižšie ako táto hodnota.

▼**M8**

Pri každom komplexnom testovacom cykle sa testovaná chemikália považuje za **negatívnu**, ak:

1. Hodnota TC_{min} prekračuje 80 % maximálnej reakcie referenčného štandardu (REF_{80} = 20 % inhibícia).

2. Menej ako dve koncentrácie testovanej chemikálie sa rovnajú hodnote REF_{80} alebo sú nižšie ako táto hodnota.

60. Na charakterizovanie potencie pozitívnej reakcie testovanej chemikálie sa uvádza rozsah účinku (agonistický účinok: TC_{max}, antagonistický účinok: TC_{min}) a koncentrácia, pri ktorej dochádza k účinku (agonistický účinok: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; antagonistický účinok: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}).

SPRÁVA O TESTE

61. Pozri odsek 20 v časti ZLOŽKY SKÚŠKY TRANSAKTIVÁCIE ER

LITERATÚRA

(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.

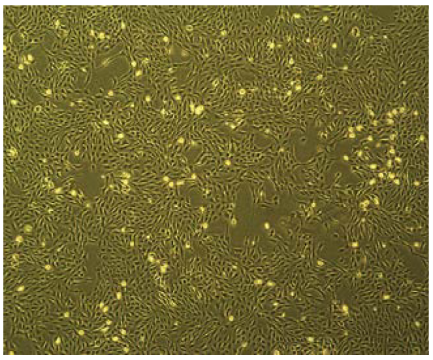
▼**M8**

Dodatok 4.1:

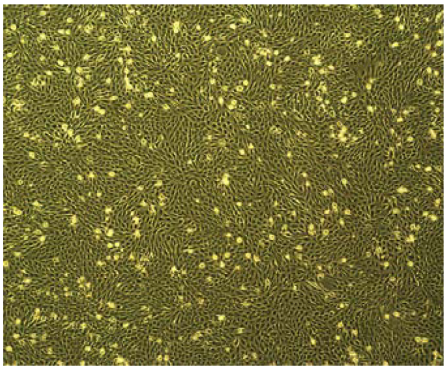
VIZUÁLNA KONTROLA ŽIVOTASCHOPNOSTI BUNIEK



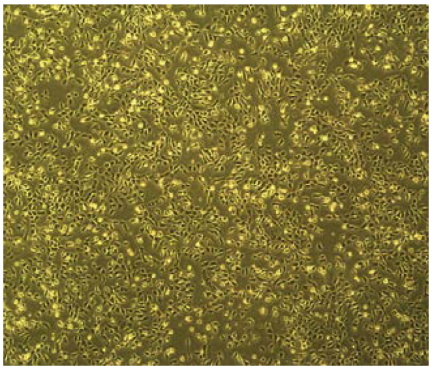
< 5 % konfluencia. Práve sa uskutočnilo naočkovanie buniek. 100 % životaschopnosť buniek. Klasifikácia: „žiadna cytotoxicita“.



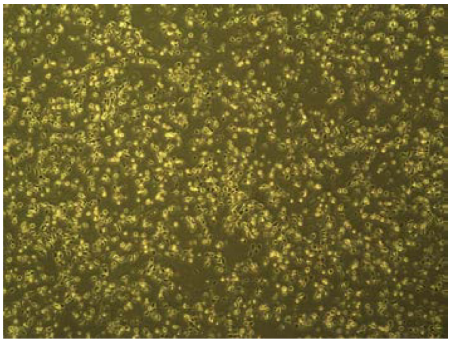
> 85 % konfluencia. V tomto štádiu sú bunky vystavené testovanej chemikálii. > 95 % životaschopnosť buniek.
Klasifikácia: „žiadna cytotoxicita“.



> 95 % konfluencia. Bunky sú nahustené a začínajú prerastať. > 95 % životaschopnosť buniek. Klasifikácia: „žiadna cytotoxicita“.



< 25 % životaschopnosť buniek. Bunky sa začínajú oddeľovať a znižuje sa miera kontaktu medzi nimi. Bunky sú zaokrúhlené. Klasifikácia: „cytotoxicita“.



< 5 % životaschopnosť buniek. Bunky sú úplne oddelené a kontakt medzi nimi je prerušený. Bunky sú zaokrúhlené. Klasifikácia: „cytotoxicita“.

▼M8

B.67. *IN VITRO* TESTY NA GÉNOVÉ MUTÁCIE CICAVČÍCH BUNIEK S VYUŽITÍM GÉNU TYMIDÍNKINÁZY

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda (TM) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov 490 (2016). Testovacie metódy sa pravidelne preskúmavajú a revidujú vzhľadom na vedecký pokrok, regulačné potreby a dobré životné podmienky zvierat. Skúška lymfómu myší (MLA) a test TK6 s využitím lokusu tymidínkinázy (TK) boli pôvodne súčasťou testovacej metódy B.17. Následne sa v rámci Expertnej pracovnej skupiny pre MLA organizácie IWGT (Medzinárodný seminár o testovaní genotoxicity) vytvorili medzinárodne harmonizované odporúčania pre kritériá prijateľnosti skúšky a interpretáciu údajov pre skúšku MLA (1) (2) (3) (4) (5), pričom tieto odporúčania sú začlenené do tejto novej testovacej metódy B.67. Táto testovacia metóda je sformulovaná pre skúšku MLA a pre test TK6, keďže využíva aj lokus TK. Zatiaľ čo sa skúška MLA často používa na regulačné účely, test TK6 sa používa omnoho zriedkavejšie. Je potrebné poznamenať, že napriek podobnosti medzi sledovanými parametrami nie sú tieto dve bunkové línie zameniteľné a v rámci regulačných programov sa môže oprávnene uprednostniť jedna metóda pred druhou na konkrétne regulačné použitie. Napríklad validácia skúšky MLA preukázala jej vhodnosť na účely detekcie nielen génovej mutácie, ale aj schopnosti testovanej chemikálie vyvolať štrukturálne poškodenie chromozómu. Táto testovacia metóda je súčasťou série testovacích metód týkajúcich sa genetickej toxikológie. Bol vypracovaný dokument OECD, ktorý obsahuje stručné informácie o testovaní v oblasti genetickej toxikológie a prehľad posledných zmien, ktoré sa vykonali v usmerneniach OECD na vykonávanie testov v oblasti genetickej toxicity (6).

2. *In vitro* test na génové mutácie cicavčích buniek sa používa na zistenie génových mutácií vyvolaných chemikáliami. V bunkových líniách, ktoré sa používajú v týchto testoch, sa merajú priame mutácie v reportérových génoch, konkrétne v endogénnom géne tymidínkinázy (*TK* pri ľudských bunkách a *Tk* pri bunkách hlodavcov, spoločne sa v tejto testovacej metóde označuje ako *TK*). Táto testovacia metóda je určená na použitie s dvomi bunkovými líniami: bunkovou líniou myšacieho lymfómu L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C (so všeobecným označením L5178Y) a TK6 ľudskou lymfoblastoidnou bunkovou líniou (so všeobecným označením TK6). Hoci sa tieto dve bunkové línie líšia z hľadiska pôvodu, bunkového rastu, statusu p53 atď., testy na génové mutácie *TK* možno pri oboch typoch buniek uskutočniť podobným spôsobom podľa opisu v tejto testovacej metóde.

3. Vďaka autozomálnej a heterozygotnej povahe génu tymidínkinázy je možná detekcia životaschopných kolónií, ktorých bunky majú nedostatok enzýmu tymidínkinázy v dôsledku mutácie z $TK^{+/-}$ na $TK^{-/-}$. Tento nedostatok môže byť spôsobený genetickými udalosťami, ktoré ovplyvňujú gén *TK*, vrátane génových mutácií (bodové mutácie, mutácie s posunom čítacieho rámca, malé delécie atď.) a chromozómovými udalosťami (veľké delécie, štrukturálne chromozómové aberácie a mitotické rekombinácie). Chromozómové udalosti sa prejavujú stratou heterozygozity, čo je bežná genetická zmena tumor supresorových génov v procese vzniku tumorov u človeka. Teoreticky možno v rámci skúšky MLA detegovať stratu celého chromozómu, ktorý je nosičom génu *TK*, v dôsledku poruchy deliaceho vretienka a/alebo mitotickej nondisjunkcie. Z kombinácie cytogenetickej a molekulárnej analýzy je jednoznačne zrejmé, že niektoré mutanty TK v rámci skúšky MLA sú spôsobené nondisjunkciou. Z analýzy váhy dôkazov však vyplýva, že testy na génové mutácie *TK* neumožňujú spoľahlivú detekciu aneugénov pri uplatnení štandardných kritérií cytotoxicity (podľa opisu v tejto testovacej metóde), a preto nie je vhodné používať tieto testy na detekciu aneugénov (7) (8) (9).

▼**M8**

4. Pri testoch na génové mutácie *TK* vznikajú dve odlišné fenotypové triedy mutantov *TK*: normálne rastúce mutanty, ktoré rastú rovnakou rýchlosťou ako heterozygotné bunky TK, a pomaly rastúce mutanty, ktoré pri raste vykazujú predĺžené časy zdvojenia. Normálne rastúce a pomaly rastúce mutanty možno v rámci skúšky MLA rozpoznať ako mutanty s veľkými, resp. malými kolóniami a v rámci testu TK6 ako mutanty so skorým, resp. neskorým vznikom kolónií. Molekulárna a cytogenetická povaha mutantov s veľkými a malými kolóniami v rámci skúšky MLA bola podrobne preskúmaná (8) (10) (11) (12) (13). Takisto sa vo veľkej miere skúmala molekulárna a cytogenetická povaha skoro vznikajúcich a neskoro vznikajúcich mutantov v rámci testu TK6 (14) (15) (16) (17). Pomaly rastúce mutanty pri oboch typoch buniek utrpeli genetické poškodenie, ktoré sa týka predpokladaných génov regulujúcich rast v blízkosti lokusu *TK* a spôsobuje predĺžené časy zdvojenia a oneskorené vytváranie kolónií alebo vytváranie malých kolónií (18). Indukcia pomaly rastúcich mutantov sa dáva do súvislosti s chemikáliami, ktoré vyvolávajú závažné štrukturálne zmeny na úrovni chromozómov. Bunky, ktorých poškodenie sa netýka predpokladaných génov regulujúcich rast v blízkosti lokusu TK, rastú rýchlosťou podobnou rodičovským bunkám a stávajú sa normálne rastúcimi mutantmi. Indukcia primárne normálne rastúcich mutantov sa dáva do súvislosti s chemikáliami, ktoré primárne pôsobia ako bodové mutagénne látky. Je preto nevyhnutné stanoviť počet pomaly rastúcich a normálne rastúcich mutantov tak, aby sa zahrnuli všetky mutanty a aby sa získali určité poznatky o typoch poškodenia (mutagény verzus klastogény) vyvolaných testovanou chemikáliou (10) (12) (18) (19).

5. Testovacia metóda je usporiadaná tak, aby poskytovala všeobecné informácie k skúške MLA aj k testu TK6, ako aj špecializované usmernenie k jednotlivým testom.

6. Vymedzenie použitých pojmov sa uvádza v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

7. Testy vykonávané *in vitro* si vo všeobecnosti vyžadujú použitie exogénneho zdroja metabolickej aktivácie. Exogénny systém metabolickej aktivácie nenapodobňuje v plnej miere podmienky *in vivo*.

8. Je potrebné dbať na to, aby sa predišlo podmienkam, ktoré by mohli viesť k falošným pozitívnym výsledkom (t. j. možnej interakcii so systémom testovania), ktoré by neboli spôsobené interakciou medzi testovanou chemikáliou a genetickým materiálom bunky, pričom medzi takéto podmienky patria zmeny pH alebo osmolality, interakcia so zložkami média (20) (21) alebo nadmerné úrovne cytotoxicity (22) (23) (24). Cytotoxicita, ktorá prekračuje odporúčané horné hranice cytotoxicity uvedené v odseku 28, sa na účely skúšky MLA a testu TK6 považuje za nadmernú. Okrem toho je potrebné poznamenať, že testované chemikálie, ktoré sú analógmi tymidínu alebo sa správajú ako analógy tymidínu, môžu zvýšiť frekvenciu mutácií v dôsledku selektívneho rastu spontánnych mutantov na pozadí počas ošetrovania buniek a na ich primerané hodnotenie sa môžu vyžadovať dodatočné testovacie metódy (25).

9. V prípade vyrobených nanomateriálov môže byť potrebné túto testovaciu metódu osobitne upraviť, tieto úpravy však nie sú opísané v tejto testovacej metóde.

10. Pred použitím tejto testovacej metódy na testovanie zmesi s cieľom generovať údaje na zamýšľaný regulačný účel by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na tento účel, a ak áno, tak prečo. Takéto úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi.

▼**M8**

11. Mutantné bunky s nedostatočnou aktivitou enzýmu tymidínkinázy z dôvodu mutácie $TK^{+/-}$ na $TK^{-/-}$ sú odolné voči cytostatickým účinkom pyrimidínového analógu trifluorotymidínu (TFT). Bunky s dostatkom *TK* sú citlivé na TFT, ktorý spôsobuje inhibíciu bunkového metabolizmu a zastavuje ďalšie delenie buniek. Mutantné bunky sú tak za prítomnosti TFT schopné rozširovať sa a vytvárať viditeľné kolónie, zatiaľ čo bunky, ktoré obsahujú enzým TK, toho schopné nie sú.

PRINCÍP TESTU

12. Bunky v suspenzii sa vystavia testovanej chemikálii s exogénnym zdrojom metabolickej aktivácie i bez takéhoto zdroja (pozri odsek 19) na primeraný čas (pozri odsek 33) a následne sa subkultivujú na stanovenie cytotoxicity a na umožnenie fenotypového prejavu pred mutantnou selekciou. Cytotoxicita sa pri skúške MLA stanovuje na základe relatívneho nárastu celkového počtu buniek (RTG – pozri odsek 25) a pri teste TK6 na základe relatívneho prežitia (RS – pozri odsek 26). Ošetrené kultúry sa primeraný čas, charakteristický pre každý typ buniek (pozri odsek 37), udržiavajú v rastovom médiu, čo umožní takmer optimálny fenotypický prejav indukovaných mutácií. Po fenotypovom prejave sa frekvencia mutácií stanovuje zasadením známeho počtu buniek do média obsahujúceho selektívne činidlo na zistenie mutantných kolónií a do média bez selektívneho činidla na stanovenie klonovacej účinnosti (životaschopnosti). Po vhodnom inkubačnom čase sa kolónie zrátajú. Frekvencia mutácií sa vypočíta na základe počtu mutantných kolónií s korekciou podľa klonovacej účinnosti v čase mutantnej selekcie.

OPIS METÓDY

Príprava

Bunky

13. Pri skúške MLA: Keďže skúška MLA bola vytvorená a charakterizovaná pomocou vedľajšej línie $TK^{+/-}$-3.7.2C buniek L5178Y, pri skúške MLA sa musí použiť táto konkrétna vedľajšia línia. Bunková línia L5178Y bola odvodená od lymfómu týmusu vyvolaného metylcholantrénom z myši DBA-2 (26). Clive a spolupracovníci ošetrili bunky L5178Y (ktoré Clive označil ako $TK^{+/+}$-3) etylmetán sulfonátom a izolovali klon $TK^{-/-}$ (s označením $TK^{-/-}$-3.7) pomocou brómdeoxyuridínu ako selektívneho činidla. Z klonu $TK^{-/-}$ sa izoloval spontánny klon $TK^{+/-}$ (s označením $TK^{+/-}$-3.7.2.) a subklon (s označením $TK^{+/-}$-3.7.2C), ktoré boli charakterizované na použitie v skúške MLA (27). Bol zverejnený karyotyp pre bunkovú líniu (28) (29) (30) (31). Modálny počet chromozómov je 40. Prítomný je jeden metacentrický chromozóm (t12;13), ktorý sa počíta za jeden chromozóm. Lokus *TK* pri myšiach sa nachádza na distálnom konci chromozómu 11. Bunková línia L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C obsahuje mutácie v oboch alelách p53 a vytvára mutantnú bielkovinu p53 (32) (33). Status p53 bunkovej línie $TK^{+/-}$-3.7.2C pravdepodobne zodpovedá za schopnosť testu detegovať poškodenie veľkého rozsahu (17).

14. Pri teste TK6: TK6 je ľudská lymfoblastoidná bunková línia. Rodičovská bunková línia je bunková línia transformovaného vírusu Epsteina a Barrovej (EBV), WI-L2, ktorá bola pôvodne získaná od 5-ročného chlapca s dedičnou sférocytózou. Prvý izolovaný klon, HH4, bol mutagenizovaný pomocou ICR191 a bola vytvorená heterozygotná bunková línia *TK*, TK6 (34). Bunky TK6 sú takmer diploidné a reprezentatívny karyotyp je 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Lokus *TK* u ľudí sa nachádza na dlhom ramene chromozómu 17. TK6 je p53-kompetentná bunková línia, pretože obsahuje normálnu (*wild type*) sekvenciu p53 v oboch alelách a dochádza pri nej k expresii len normálnej (*wild type*) bielkoviny p53 (36).

▼M8

15. V prípade skúšky MLA aj testu TK6 sa pri počiatočnom vytvorení alebo dopĺňaní zásoby materských buniek odporúča, aby skúšobné laboratórium potvrdilo neprítomnosť kontaminácie mykoplazmou, stanovilo karyotyp buniek alebo farebne označilo chromozómy, v ktorých sa nachádza lokus *TK*, ako aj overilo časy zdvojenia populácie. Mala by sa stanoviť dĺžka bežného bunkového cyklu buniek použitých v skúšobnom laboratóriu, ktorá by mala byť v súlade s bunkovými charakteristikami uvedenými v literatúre (16) (19) (37). Táto zásoba materských buniek sa má uskladňovať pri teplote –150 °C alebo nižšej a má slúžiť na prípravu všetkých pracovných zásob buniek.

16. Buď pred vytvorením veľkého počtu kryogénne zakonzervovaných pracovných zásob alebo pred použitím v rámci pokusu môže byť potrebné prečistiť kultúru od existujúcich mutantných buniek [pokiaľ frekvencia mutácií (MF) kontroly s aplikáciou rozpúšťadla už nie je v prijateľnom rozsahu – pozri tabuľku 2 pre skúšku MLA]. Dosahuje sa to pomocou metotrexátu (aminopterín), ktorý slúži na vylúčenie TK-deficientných buniek, a pridaním tymidínu, hypoxantínu a glycínu (L5178Y) alebo 2'-deoxycytidínu (TK6) ku kultúre na zabezpečenie optimálneho rastu TK-kompetentných buniek (19) (38) (39) a (40) pre TK6. Všeobecné odporúčania týkajúce sa osvedčených postupov v súvislosti s udržiavaním bunkových kultúr, ako aj špecifické odporúčania pre bunky L5178Y a TK6 sa nachádzajú v zdrojoch (19) (31) (37) (39) (41). Pre laboratóriá, ktoré potrebujú zásoby materských buniek na začatie skúšky MLA alebo testu TK6, alebo ktoré potrebujú získať nové zásoby materských buniek, je k dispozícii bunková banka obsahujúca riadne charakterizované bunky (37).

Médiá a podmienky kultivácie

17. Pri oboch testoch sa na udržiavanie kultúr má použiť vhodné kultivačné médium a inkubačné podmienky (napr. kultivačné nádoby, atmosféra s vyššou relatívnou vlhkosťou a 5 % CO_2, inkubačná teplota 37 °C). Bunkové kultúry sa majú vždy udržiavať v podmienkach, v ktorých je zabezpečené, že ich rast prebieha v logaritmickej fáze. Osobitne dôležité je zvoliť médiá a podmienky kultivácie tak, aby bol zabezpečený optimálny rast buniek počas doby expresie a klonovanie mutantných aj nemutantných buniek. V prípade MLA a TK6 je taktiež dôležité, aby podmienky kultivácie zaisťovali optimálny rast mutantov TK s veľkými kolóniami/skorým vznikom, ako aj s malými kolóniami/neskorým vznikom. Ďalšie podrobnosti o kultivácii vrátane potreby správne tepelne inaktivovať konské sérum, ak sa počas mutantnej selekcie používa médium RPMI, sa nachádzajú v zdrojoch (19) (31) (38) (39) (40) (42).

Príprava kultúr

18. Bunky sa rozmnožujú zo zásobných kultúr a nasadia sa do kultivačného média v takej hustote, aby pri suspenzných kultúrach pokračoval exponenciálny rast počas času ošetrenia a doby expresie.

Metabolická aktivácia

19. Ak sa použijú bunky L5178Y a TK6, mali by sa použiť exogénne systémy metabolickej aktivácie, pretože tieto bunky majú nedostatočnú endogénnou metabolickú kapacitu. Najpoužívanejším systémom, ktorý sa štandardne odporúča, pokiaľ to nie je odôvodnené inak, je kofaktormi obohatená postmitochondriálna frakcia (S9) pripravená z pečene hlodavcov (väčšinou potkanov) ošetrená činidlami na indukciu enzýmov, ako je napríklad Aroclor 1254 (43) (44) (45) alebo kombinácia fenobarbitalu a β-naftoflavónu (46) (47) (48) (49) (50) (51). Uvedená kombinácia nie je v rozpore so Štokholmským dohovorom o perzistentných organických látkach (52) a preukázateľne

▼M8

je pri indukovaní oxidáz so zmiešanými funkciami rovnako účinná ako Aroclor 1254 (45) (46) (47) (48) (49). Frakcia S9 sa v konečnom testovacom médiu zvyčajne používa v koncentráciách od 1 % do 2 %, môže sa však zvýšiť až na 10 obj. %. Výber typu a koncentrácie použitého exogénneho systému metabolickej aktivácie alebo metabolického induktora môže ovplyvniť trieda testovaných chemikálií.

Príprava testovaných chemikálií

20. Testované chemikálie v tuhom skupenstve by sa podľa potreby mali rozpustiť vo vhodnom rozpúšťadle pred tým, než sa nimi ošetria bunky (pozri odsek 21). Kvapalné testované chemikálie možno pridať priamo do testovacieho systému a/alebo pred aplikáciou na testovací systém rozriediť. Plynné alebo prchavé testované chemikálie by sa mali testovať tak, že sa štandardné protokoly vhodne upravia, napríklad sa v nich uskutoční ošetrenie v uzavretých kultivačných nádobách (53) (54) (55). Prípravky testovanej chemikálie by sa mali pripraviť bezprostredne pred ošetrením, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na prijateľnosť uskladnenia.

PODMIENKY TESTOVANIA

Rozpúšťadlá

21. Rozpúšťadlo by sa malo zvoliť tak, aby sa optimalizovala rozpustnosť testovanej chemikálie bez toho, aby rozpúšťadlo malo negatívny vplyv na vykonávanie testu (napr. zmenou rastu buniek), ovplyvňovalo integritu testovanej chemikálie, reagovalo s kultivačnými nádobami a narušovalo systém metabolickej aktivácie. Odporúča sa, pokiaľ je to možné, najskôr zvážiť použitie vodného rozpúšťadla (alebo kultivačného média). Osvedčenými rozpúšťadlami sú voda alebo dimetylsulfoxid. Organické rozpúšťadlá by vo všeobecnosti nemali presiahnuť 1 obj. % a vodné rozpúšťadlá (fyziologický roztok alebo voda) by nemali presiahnuť 10 obj. % v konečnom médiu určenom na testovanie. Ak sa použijú iné ako osvedčené rozpúšťadlá (napr. etanol alebo acetón), ich použitie by malo byť podložené údajmi o ich kompatibilite s testovanými chemikáliami a testovacím systémom a o tom, že v použitej koncentrácii nie sú genotoxické. V prípade, že tieto podkladové údaje nie sú k dispozícii, je dôležité do testu doplniť neošetrené kontroly (pozri vymedzenie pojmov v dodatku 1) s cieľom preukázať, že zvolené rozpúšťadlo nevyvoláva žiadne nepriaznivé ani mutagénne účinky.

MERANIE CYTOTOXICITY A VÝBER KONCENTRÁCIÍ TESTOVANEJ CHEMIKÁLIE

22. Pri stanovovaní najvyššej koncentrácie testovanej chemikálie by sa malo zabrániť použitiu koncentrácií, ktoré majú schopnosť vyvolať falošné pozitívne reakcie, napr. koncentrácií vyvolávajúcich nadmernú cytotoxicitu (pozri odsek 28), zrážanie kultivačného média (pozri odsek 29) alebo výrazné zmeny pH alebo osmolality (pozri odsek 8). Ak testovaná chemikália v čase, keď sa pridáva, spôsobuje výraznú zmenu pH média, mohlo by sa pH upraviť aplikovaním tlmivého roztoku do konečného média určeného na testovanie tak, aby nedošlo k falošným pozitívnym výsledkom a aby sa zachovali vhodné kultivačné podmienky.

23. Koncentrácia sa určuje na základe cytotoxicity a iných faktorov (pozri odseky 27 – 30). Aj keď z hľadiska lepšieho definovania koncentrácií, ktoré sa majú použiť v hlavnom pokuse, môže byť užitočné hodnotenie cytotoxicity v počiatočnom teste, počiatočný test nie je povinný. Aj keď sa vykoná počiatočné hodnotenie cytotoxicity, vyžaduje sa aj meranie cytotoxicity jednotlivých kultúr v hlavnom pokuse. Ak sa uskutočňuje pokus na zistenie rozsahu, má zahŕňať široký rozsah koncentrácií, pričom sa môže ukončiť na prvý deň po ošetrení alebo môže pokračovať počas expresie na druhý deň až po mutantnú selekciu (ak sa zdá, že použité koncentrácie sú vhodné).

▼M8

24. Cytotoxicita sa má stanoviť pre jednotlivé samostatné testovacie kultúry a pre kontrolnú kultúru: metódy pre MLA (2) a TK6 (15) sú vymedzené na základe medzinárodne dohodnutých postupov.

25. Pri verzii MLA s využitím agaru aj verzii s využitím mikrotitračnej metódy: Cytotoxicita sa hodnotí na základe relatívneho nárastu celkového počtu buniek (RTG), ktorý pôvodne vymedzili Clive a Spector v roku 1975 (2). Súčasťou tohto merania je relatívny nárast počtu buniek v suspenzii (RSG: testovacia kultúra v porovnaní s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla) počas ošetrovania buniek, čas expresie a relatívna klonovacia účinnosť (RCE: testovacia kultúra v porovnaní s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla) v čase selekcie mutantov (2). Je potrebné poznamenať, že relatívny nárast počtu buniek v suspenzii zahŕňa všetky straty buniek, ku ktorým dôjde v testovacej kultúre počas ošetrenia (pozri vzorce v dodatku 2).

26. Pri teste TK6: Cytotoxicita sa hodnotí na základe relatívneho prežitia (RS), t. j. klonovacej účinnosti buniek naočkovaných bezprostredne po ošetrení pri zohľadnení všetkých strát buniek počas ošetrenia, a to na základe počtu buniek v porovnaní s negatívnou kontrolou (ktorej je priradená miera prežitia 100 %) (pozri vzorec v dodatku 2).

27. Mali by sa vyhodnotiť aspoň štyri testovacie koncentrácie (bez kontroly s rozpúšťadlom a pozitívnej kontroly), ktoré spĺňajú kritériá prijateľnosti (vhodná cytotoxicita, počet buniek atď.). Hoci sa odporúča použitie duplicitných kultúr, pri každej testovanej koncentrácii sa môžu použiť buď paralelné kultúry, alebo jednotlivé ošetrené kultúry. Výsledky získané z paralelných kultúr pri danej koncentrácii sa majú uvádzať samostatne, možno ich však zlúčiť na účely analýzy údajov (55). V prípade testovaných chemikálií, ktoré vykazujú malú alebo nevykazujú žiadnu cytotoxicitu, budú za bežných okolností vhodné približne dvojnásobné až trojnásobné intervaly koncentrácií. Pri výskyte cytotoxicity by vybraté koncentrácie mali pokrývať rozsah cytotoxicity od koncentrácie, ktorá vyvoláva cytotoxicitu, ako sa opisuje v odseku 28, a zahŕňať koncentrácie, pri ktorých je cytotoxicita mierna a slabá alebo žiadna. Mnohé testované chemikálie vykazujú strmé krivky závislosti reakcie od koncentrácie a s cieľom pokryť celý rozsah cytotoxicity alebo podrobne preskúmať reakciu v závislosti od koncentrácie môže byť nevyhnutné použiť viac koncentrácií s tesnejším odstupom a viac ako štyri koncentrácie, najmä v situáciách, keď sa vyžaduje opakovať pokus (pozri odsek 70). Použitie viac ako štyroch koncentrácií môže byť obzvlášť dôležité pri použití jednotlivých kultúr.

28. Ak maximálna koncentrácia vychádza z cytotoxicity, najvyššia koncentrácia by mala dosahovať hodnotu RTG v rozsahu 20 až 10 % pre MLA a hodnotu RS v rozsahu 20 až 10 % pre TK6 (odsek 67).

29. V prípade slabo rozpustných testovaných chemikálií, ktoré nie sú cytotoxické pri koncentráciách nižších, než je najnižšia nerozpustná koncentrácia, by najvyššia analyzovaná koncentrácia mala na konci ošetrenia testovanou chemikáliou vyvolať zakalenie alebo zrazeninu viditeľnú voľným okom alebo pomocou inverzného mikroskopu. Aj keď sa cytotoxicita vyskytne pri koncentrácii vyššej, ako je najnižšia nerozpustná koncentrácia daných chemikálií, testovať sa odporúča len pri jednej koncentrácii vyvolávajúcej zakalenie alebo viditeľnú zrazeninu, pretože falošné účinky môžu byť spôsobené zrazeninou. Keďže sa pri skúške MLA a teste TK6 používajú suspenzné kultúry, je potrebné zabezpečiť, aby táto zrazenina nenarušovala vykonávanie testu. Môže byť takisto užitočné pred pokusom stanoviť rozpustnosť v kultivačnom médiu.

▼M8

30. Ak sa nezistí žiadna zrazenina ani obmedzujúca cytotoxicita, najvyššia testovaná koncentrácia by mala zodpovedať 10 mM, 2 mg/ml alebo 2 µl/ml, podľa toho, ktorá je najnižšia (57) (58). Keď testovaná chemikália nemá určené zloženie, napr. látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály [t. j. chemické látky neznámeho alebo variabilného zloženia (UVCB)], extrakty z prostredia atď., môže byť potrebná vyššia maximálna koncentrácia (napr. 5 mg/ml) v prípade absencie dostatočnej cytotoxicity, aby sa zvýšila koncentrácia jednotlivých zložiek. Je však potrebné poznamenať, že tieto požiadavky sa môžu v prípade humánnych liekov líšiť (59).

Kontroly

31. Pre všetky pokusné podmienky by sa mali zahrnúť súbežné negatívne kontroly (pozri odsek 21), ktoré pozostávajú zo samotného rozpúšťadla v médiu určenom na testovanie a s ktorými sa manipuluje rovnakým spôsobom ako s ošetrenými kultúrami.

32. Súbežné pozitívne kontroly sú potrebné na preukázanie schopnosti laboratória identifikovať mutagénne látky v podmienkach použitého testovacieho protokolu a v prípade potreby aj na preukázanie účinnosti exogénneho systému metabolickej aktivácie, ako aj na preukázanie primeranej detekcie malých/neskoro vznikajúcich a veľkých/skoro vznikajúcich mutantov *TK*. Príklady pozitívnych kontrol sú uvedené v tabuľke 1 ďalej. V odôvodnených prípadoch sa môžu na pozitívnu kontrolu použiť alternatívne látky. Keďže testy na cicavčích bunkách *in vitro* na zistenie genetickej toxicity sú pri krátkodobých ošetreniach (3 – 4 hodiny) vykonávaných súbežne s metabolickou aktiváciou a bez nej a pri rovnakom čase ošetrenia dostatočne štandardizované, možno použitie pozitívnych kontrol obmedziť na testovanie mutagénnej látky vyžadujúcej metabolickú aktiváciu. V tomto prípade reakcia na túto jednu pozitívnu kontrolu preukáže činnosť systému metabolickej aktivácie, ako aj vnímavosť testovacieho systému. Dlhodobé ošetrovanie (t. j. 24 hodín bez S9) by však malo mať svoju vlastnú pozitívnu kontrolu, keďže dĺžka ošetrovania sa bude líšiť od testu s metabolickou aktiváciou. Každá pozitívna kontrola sa má použiť pri jednej alebo viacerých koncentráciách, pri ktorých sa očakáva reprodukovateľný a zistiteľný nárast voči pozadiu s cieľom preukázať citlivosť testovacieho systému, pričom reakciu by nemalo narušiť prekročenie limitov cytotoxicity, ktoré sú stanovené pre túto testovaciu metódu (pozri odsek 28).

Tabuľka 1

Referenčné látky odporúčané na posúdenie spôsobilosti laboratória a na výber pozitívnych kontrol

Kategória	Látka	Registračné číslo CAS
1. Mutagénne látky aktívne bez metabolickej aktivácie		
	metyl-metánsulfonát	66-27-3
	mitomycín C	50-07-7
	4-nitrochinolín-N-oxid	56-57-5
2. Mutagénne látky vyžadujúce metabolickú aktiváciu		
	benzo[a]pyrén	50-32-8
	cyklofosfamid (monohydrát)	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-dimetylbenzantracén	57-97-6
	3-metylcholantrén	56-49-5

▼M8

POSTUP

Ošetrenie testovanou chemikáliou

33. Proliferujúce bunky sa ošetria testovanou chemikáliou za prítomnosti aj za neprítomnosti systému metabolickej aktivácie. Expozícia trvá primeraný čas (primeraný čas je zvyčajne 3 až 4 hodiny). Je však potrebné poznamenať, že tieto požiadavky sa môžu v prípade humánnych liekov líšiť (59). Pokiaľ ide o skúšku MLA, v prípadoch, keď krátkodobé ošetrenie vykazuje negatívne výsledky a informácie naznačujú potrebu dlhšieho ošetrenia [napr. analógy nukleozidu, slabo rozpustné chemikálie (5) (59)], je potrebné zvážiť vykonanie testu s dlhším časom ošetrenia, t. j. 24 hodín bez S9.

34. Minimálny počet buniek použitých v každej z testovacích kultúr (kontrolnej aj ošetrenej) v každom štádiu testu je založený na frekvencii spontánnych mutácií. Všeobecným usmernením je ošetriť a subkultivovať dostatočný počet buniek v každej pokusnej kultúre na to, aby sa vo všetkých fázach testu (ošetrovanie, fenotypový prejav a mutantná selekcia) zachovalo najmenej 10, no ideálne 100 spontánnych mutantov (56).

35. V prípade skúšky MLA je odporúčaná prijateľná frekvencia spontánnych mutácií v rozsahu 35 – 140 × 10^{-6} (pri verzii s využitím agaru) a 50 – 170 × 10^{-6} (pri verzii s mikrotitračnou metódou) (pozri tabuľku 2). Na to, aby sa zabezpečilo prežitie najmenej 10 a ideálne 100 spontánnych mutantov po ošetrení v každej testovacej kultúre, je potrebné ošetriť najmenej 6 × 10^{6} buniek. Ošetrením takéhoto počtu buniek a zachovaním dostatočného počtu buniek počas expresie a klonovania na účely mutantnej selekcie sa zabezpečí dostatočný počet spontánnych mutantov (najmenej 10) počas všetkých fáz pokusu, a to aj pri kultúrach ošetrených pomocou koncentrácií, ktoré spôsobujú 90 % cytotoxicitu (pri meraní podľa hodnoty RTG na úrovni 10 %) (19) (38) (39).

36. V prípade testu TK6 je frekvencia spontánnych mutácií vo všeobecnosti v rozsahu 2 až 10 × 10^{-6}. Na to, aby sa zabezpečilo prežitie najmenej 10 spontánnych mutantov po ošetrení v každej kultúre, je potrebné ošetriť najmenej 20 × 10^{6} buniek. Ošetrením takéhoto počtu buniek sa zabezpečí dostatočný počet spontánnych mutantov (najmenej 10) aj pri kultúrach ošetrených pomocou koncentrácií, ktoré pri ošetrení spôsobujú 90 % cytotoxicitu (RS na úrovni 10 %). Okrem toho sa počas doby expresie musí kultivovať a naočkovať na účely mutantnej selekcie dostatočný počet buniek (60).

Čas do prejavenia fenotypu a meranie cytotoxicity a frekvencie mutácií

37. Na konci obdobia ošetrovania sa bunky počas stanoveného času kultivujú, aby sa umožnil takmer optimálny fenotypový prejav novoindukovaných mutantov, a to špecificky pre každú bunkovú líniu. V prípade MLA je čas do prejavenia fenotypu 2 dni. V prípade TK6 je čas do prejavenia fenotypu 3 – 4 dni. Ak sa používa 24-hodinové ošetrovanie, čas do prejavenia fenotypu sa začína po skončení ošetrovania.

38. Počas času do prejavenia fenotypu sa každodenne určuje počet buniek. V prípade MLA slúžia denné počty buniek na výpočet denného nárastu počtu buniek v suspenzii (SG). Po uplynutí dvojdňovej doby expresie sa bunky umiestnia do média so selektívnym činidlom aj bez selektívneho činidla na určenie počtov mutantov (platničky na účely selekcie), resp. klonovacej účinnosti (platničky na účely životaschopnosti). V prípade MLA existujú dve rovnako prijateľné metódy na klonovanie na účely mutantnej selekcie, pričom pri jednej sa využíva slabý agar a pri druhej kvapalné médium v 96-jamkových platničkách (19) (38) (39). V prípade TK6 sa pri klonovaní používajú kvapalné médiá a 96-jamkové platničky (16).

▼M8

39. Jediným odporúčaným selektívnym činidlom pre mutanty *TK* je trifluorotymidín (TFT) (61).

40. V prípade MLA sa Petriho misky s agarom a mikrotitračné platničky spočítajú po 10 – 12 dňoch inkubácie. V prípade TK6 sa pri kolóniách v mikrotitračných platničkách po 10 – 14 dňoch vyhodnotí výskyt skoro vznikajúcich mutantov. S cieľom zahrnúť pomaly rastúce (neskoro vznikajúce) mutanty TK6 je potrebné po spočítaní skoro vznikajúcich mutantov bunkám doplniť rastové médium a TFT a platničky inkubovať počas ďalších 7 – 10 dní (62). Diskusia k stanoveniu počtu pomaly a normálne rastúcich mutantov *TK* sa nachádza v odsekoch 42 a 44.

41. Vhodné výpočty pre oba testy zahŕňajúce obe metódy (s využitím agaru a mikrotitračných platničiek) pre MLA sú uvedené v dodatku 2. Pri metóde MLA s využitím agaru sa kolónie spočítajú a počet mutantných kolónií sa na účely výpočtu frekvencie mutácií upraví na základe klonovacej účinnosti. Pri verzii MLA a TK6 s mikrotitračnými platničkami sa klonovacia účinnosť v platničkách na účely selekcie aj v platničkách na účely klonovacej účinnosti určí podľa Poissonovho rozdelenia (63). Z týchto dvoch klonovacích účinností sa vypočíta frekvencia mutácií.

Charakterizovanie mutantnej kolónie

42. Ak je testovaná chemikália v prípade MLA pozitívna (pozri odseky 62 – 63), charakterizovanie kolónie na základe merania veľkosti alebo rastu kolónie sa uskutoční minimálne na jednej testovacej kultúre (vo všeobecnosti najvyššia prijateľná pozitívna koncentrácia) a na negatívnych a pozitívnych kontrolách. Ak je testovaná chemikália negatívna (pozri odsek 64), charakterizovanie mutantnej kolónie sa uskutoční na negatívnych a pozitívnych kontrolách. Pri metóde MLA s mikrotitračnými platničkami je vymedzené, že mutanty s malými kolóniami sú také, ktoré pokrývajú menej ako 25 % priemeru jamky, a mutanty s veľkými kolóniami sú také, ktoré pokrývajú viac ako 25 % priemeru jamky. Pri metóde s využitím agaru sa na stanovenie počtu kolónií a meranie veľkosti kolónií používa automatické počítadlo kolónií. Prístupy k meraniu veľkosti kolónií sú podrobne opísané v literatúre (19) (38) (40). Charakterizovanie kolónií na základe negatívnych a pozitívnych kontrol je potrebné na preukázanie správneho uskutočnenia štúdií.

43. Nie je možné stanoviť, že testovaná chemikália je negatívna, ak sa v pozitívnej kontrole správne nedetegujú mutanty s veľkými aj malými kolóniami. Na základe charakterizovania kolónie možno získať všeobecné informácie o schopnosti testovanej chemikálie spôsobiť bodové mutácie a/alebo chromozómové udalosti (odsek 4).

44. TK6: Normálne rastúce a pomaly rastúce mutanty sa diferencujú na základe rozdielu v inkubačnom čase (pozri odsek 40). V prípade TK6 sa vo všeobecnosti hodnotia skoro aj neskoro vznikajúce mutanty pri všetkých kultúrach vrátane negatívnych a pozitívnych kontrol. Charakterizovanie kolónií negatívnych a pozitívnych kontrol je potrebné na preukázanie správneho uskutočnenia štúdií. Nie je možné stanoviť, že testovaná chemikália je negatívna, ak sa v pozitívnej kontrole správne nedetegujú skoro aj neskoro vznikajúce mutanty. Na základe charakterizovania kolónie možno získať všeobecné informácie o schopnosti testovanej chemikálie spôsobiť bodové mutácie a/alebo chromozómové udalosti (odsek 4).

▼M8

Spôsobilosť laboratória

45. Na to, aby sa pred vykonaním rutinného testu preukázalo, či má laboratórium s daným testom dostatočné skúsenosti, malo by mať vykonanú sériu pokusov s referenčnými pozitívnymi látkami pôsobiacimi prostredníctvom rôznych mechanizmov (aspoň jedna látka aktívna s metabolickou aktiváciou a jedna látka aktívna bez metabolickej aktivácie, vybraté z látok uvedených v tabuľke 1) a s rôznymi negatívnymi kontrolami (vrátane neošetrených kultúr a rôznych rozpúšťadiel/nosičov). Reakcie týchto pozitívnych a negatívnych kontrol by mali byť v súlade s príslušnou literatúrou. Táto požiadavka sa nevzťahuje na laboratóriá, ktoré majú skúsenosti, t. j. majú dostupnú historickú databázu, ako sa vymedzuje v odsekoch 47 – 50. V prípade MLA majú byť hodnoty získané pre pozitívne aj negatívne kontroly v súlade s odporúčaniami IWGT (pozri tabuľku 2).

46. Mal by sa preskúmať výber látok na pozitívnu kontrolu (pozri tabuľku 1) s krátkym a dlhým ošetrovaním (ak sa používajú dlhé ošetrovania) za neprítomnosti metabolickej aktivácie, ako aj s krátkym ošetrovaním za prítomnosti metabolickej aktivácie, aby sa preukázala spôsobilosť zistiť mutagénne chemikálie, stanovila sa účinnosť systému metabolickej aktivácie a preukázala sa vhodnosť podmienok pre rast buniek počas ošetrovania, fenotypového prejavu a mutatnej selekcie, ako aj vhodnosť postupov hodnotenia. Rozsah koncentrácií vybraných látok by sa mal zvoliť tak, aby poskytol opakovateľné nárasty súvisiace s jednotlivými koncentráciami v porovnaní s úrovňou pozadia, aby sa tak preukázala citlivosť a dynamické rozpätie testovacieho systému.

Údaje o historických kontrolách

47. Laboratórium by malo určiť:

— rozsah a distribúciu historických pozitívnych kontrol,

— rozsah a distribúciu historických negatívnych kontrol (neošetrených, s rozpúšťadlom).

48. Pri prvom získavaní údajov súvisiacich s distribúciou historických negatívnych kontrol by súbežné negatívne kontroly mali byť v súlade s uverejnenými údajmi o negatívnych kontrolách. S pridávaním ďalších experimentálnych údajov k distribúcii kontrol by súbežné negatívne kontroly mali byť v ideálnom prípade v rámci 95 % regulačných medzí tejto distribúcie (64) (65).

49. Historickú databázu negatívnych kontrol laboratória by na začiatku malo tvoriť minimálne 10 pokusov, ale podľa možnosti by mala pozostávať aspoň z 20 pokusov vykonaných za porovnateľných pokusných podmienok. Laboratóriá by mali použiť metódy kontroly kvality, ako sú regulačné diagramy [napr. tzv. „C-charts“ alebo „X-bar charts“ (65)], s cieľom zistiť variabilitu svojich údajov týkajúcich sa pozitívnych a negatívnych kontrol a preukázať, že metodika v danom laboratóriu je „pod kontrolou“ (66). Ďalšie podrobnosti a odporúčania k vytváraniu a využívaniu historických údajov možno nájsť v literatúre (64).

50. Údaje o negatívnych kontrolách majú obsahovať frekvencie mutácií z jednej alebo prednostne z paralelných kultúr podľa opisu v odseku 27. Súbežné negatívne kontroly by v ideálnom prípade mali byť v rámci 95 % regulačných medzí distribúcie databázy historických negatívnych kontrol laboratória. V prípade, že údaje o negatívnych kontrolách nie sú v rámci 95 % regulačných medzí, môžu byť prijateľné na zaradenie do distribúcie historických kontrol, pokiaľ tieto údaje nie sú extrémne mimo uvedených medzí a pokiaľ existujú dôkazy o tom, že testovací systém je „pod kontrolou“ (pozri odsek 49), a dôkazy o tom, že nedošlo k technickému alebo ľudskému zlyhaniu.

▼M8

51. Všetky zmeny v experimentálnom protokole by sa mali posúdiť z hľadiska konzistentnosti údajov s databázami existujúcich historických kontrol v laboratóriu. Každý výrazný nesúlad by mal viesť k vytvoreniu novej databázy historických kontrol.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Prezentovanie výsledkov

52. Súčasťou prezentovania výsledkov skúšky MLA aj testu TK6 v prípade ošetrených aj kontrolných kultúr sú údaje potrebné na výpočet cytotoxicity (RTG, resp. RS) a frekvencií mutácií, ako sa uvádza ďalej.

53. V prípade MLA sa v rámci údajov o jednotlivých kultúrach uvádza RSG, RTG, klonovacia účinnosť v čase mutantnej selekcie a počet mutantných kolónií (pri verzii s využitím agaru) alebo počet prázdnych jamiek (pri verzii s mikrotitračnou metódou). Frekvencia mutácií sa vyjadruje ako počet mutantných buniek na milión živých buniek. V prípade pozitívnej reakcie sa uvádzajú frekvencie mutácií pri malých a veľkých kolóniách (a/alebo percentuálny podiel celkovej frekvencie mutácií) najmenej pri jednej koncentrácii testovanej chemikálie (vo všeobecnosti najvyššia pozitívna koncentrácia) a pri negatívnych a pozitívnych kontrolách. V prípade negatívnej reakcie sa uvádza frekvencia mutácií pri malých a veľkých kolóniách v rámci negatívnej kontroly a pozitívnej kontroly.

54. V prípade TK6 sa v rámci údajov o jednotlivých kultúrach uvádza RS, klonovacia účinnosť v čase mutantnej selekcie a počet prázdnych jamiek pri skoro vznikajúcich a neskoro vznikajúcich mutantoch. Frekvencia mutácií sa vyjadruje ako počet mutantných buniek na počet živých buniek a zahŕňa celkovú frekvenciu mutácií, ako aj frekvenciu mutácií (a/alebo percentuálny podiel celkovej frekvencie mutácií) skoro vznikajúcich a neskoro vznikajúcich mutantov.

Kritériá prijateľnosti

55. V prípade skúšky MLA aj testu TK6 musia byť pred určením celkových výsledkov pre konkrétnu testovanú chemikáliu splnené tieto kritériá:

— Testovali sa dve pokusné podmienky (krátke ošetrenie s metabolickou aktiváciou a bez metabolickej aktivácie – pozri odsek 33), pokiaľ jedna z nich neviedla k pozitívnym výsledkom.

— Analyzovateľný má byť primeraný počet buniek a koncentrácií (pozri odseky 27, 34-36).

— Kritériá výberu najvyššej koncentrácie sú v súlade s kritériami opísanými v odsekoch 28 – 30.

Kritériá prijateľnosti pre negatívne a pozitívne kontroly

56. Medzinárodný konsenzus týkajúci sa konkrétnych kritérií prijateľnosti pre skúšku MLA je výsledkom analýzy veľkého rozsahu údajov o skúške MLA, ktorú uskutočnila Expertná pracovná skupina pre MLA organizácie IWGT (1) (2) (3) (4) (5). Táto testovacia metóda preto poskytuje konkrétne odporúčania na stanovenie prijateľnosti negatívnych a pozitívnych kontrol a na hodnotenie výsledkov pre jednotlivé látky pri skúške MLA. Databáza pre test TK6 má omnoho menší rozsah a nebola predmetom hodnotenia zo strany pracovnej skupiny.

▼M8

57. V prípade MLA sa má pri každom pokuse hodnotiť, či neošetrená kontrola/kontrola s aplikáciou rozpúšťadla vyhovuje kritériám prijateľnosti pracovnej skupiny pre MLA organizácie IWGT [(4) a tabuľka 2 ďalej]), pokiaľ ide o: 1. frekvenciu mutácií (pričom frekvencie mutácií prijateľné podľa organizácie IWGT sa líšia pri verzii MLA s využitím agaru a pri verzii s mikrotitračnou metódou); 2. klonovaciu účinnosť (CE) v čase mutantnej selekcie a 3. nárast počtu buniek v suspenzii (SG) pre kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla (pozri vzorce v dodatku 2).

Tabuľka 2

Kritériá prijateľnosti pre MLA

Parameter	Metóda s využitím slabého agaru	Mikrotitračná metóda
Frekvencia mutácií	$35 – 140 \times 10^{-6}$	$50 – 170 \times 10^{-6}$
Klonovacia účinnosť	65 – 120 %	65 – 120 %
Nárast počtu buniek v suspenzii	8 – 32-násobný (ošetrovanie 3 – 4 hodiny) 32 – 180-násobný (ošetrovanie 24 hodín, pokiaľ sa uskutočňuje)	8 – 32-násobný (ošetrovanie 3 – 4 hodiny) 32 – 180-násobný (ošetrovanie 24 hodín, pokiaľ sa uskutočňuje)

58. V prípade MLA sa každý test má vyhodnotiť aj z hľadiska toho, či pozitívne kontroly spĺňajú aspoň jedno z týchto dvoch kritérií prijateľnosti, ktoré navrhla pracovná skupina organizácie IWGT:

— Danou pozitívnou kontrolou sa má preukázať absolútny nárast celkovej frekvencie mutácií, t. j. nárast nad frekvenciu spontánnych mutácií na pozadí [frekvencia vyvolaných mutácií (IMF)] najmenej o 300×10^{-6}. Najmenej 40 % hodnoty IMF má predstavovať frekvenciu mutácií pri malých kolóniách.

— Pri pozitívnej kontrole dochádza k nárastu frekvencie mutácií pri malých kolóniách najmenej o 150×10^{-6} oproti hodnote v súbežnej neošetrenej kontrole/kontrole s aplikáciou rozpúšťadla (hodnota IMF pri malých kolóniách na úrovni 150×10^{-6}).

59. V prípade TK6 bude test prijateľný, ak sa súbežná negatívna kontrola považuje za prijateľnú na doplnenie do databázy historických negatívnych kontrol laboratória, ako je opísané v odsekoch 48 – 49. Súbežné pozitívne kontroly (pozri odsek 32) by okrem toho mali vyvolať reakcie, ktoré sú zlučiteľné s reakciami generovanými v databáze historických pozitívnych kontrol, a viesť k štatisticky významnému nárastu v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou.

60. Pri oboch testoch má byť horný limit cytotoxicity zaznamenaný pri kultúre s pozitívnou kontrolou rovnaký ako pri pokusných kultúrach. Znamená to, že hodnoty RTG/RS nemajú byť nižšie ako 10 %. Na preukázanie splnenia kritérií prijateľnosti pre pozitívnu kontrolu je postačujúce použiť jednu koncentráciu (alebo jednu z koncentrácií kultúr pozitívnych kontrol, ak sa použila viac než jedna koncentrácia). Okrem toho musí byť frekvencia mutácií pozitívnej kontroly v prijateľnom rozsahu stanovenom pre laboratórium.

Hodnotenie a interpretácia výsledkov

61. V prípade skúšky MLA vykonala Expertná pracovná skupina organizácie IWGT pre oblasť myšacieho lymfómu významné práce, pokiaľ ide o biologickú relevantnosť a kritériá pozitívnej reakcie (4). Táto testovacia metóda preto poskytuje konkrétne odporúčania na interpretáciu výsledkov zo skúšky

▼**M8**

MLA v súvislosti s testovanou chemikáliou (pozri odseky 62 – 64). Databáza pre test TK6 má omnoho menší rozsah a nebola predmetom hodnotenia zo strany pracovnej skupiny. Uvedené odporúčania na interpretáciu údajov pre test TK6 sú preto všeobecnejšie (pozri odseky 65 – 66). Na oba testy sa vzťahujú dodatočné odporúčania (pozri odseky 67 – 71).

MLA

62. Odporúča sa prístup na vymedzenie pozitívnych a negatívnych reakcií, aby bolo možné uistiť sa, že zvýšená frekvencia mutácií je biologicky relevantná. Namiesto štatistickej analýzy, ktorá sa vo všeobecnosti používa pri iných testoch, je tento prístup založený na použití vopred stanovenej frekvencie vyvolaných mutácií (t. j. nárast frekvencie mutácií nad úroveň súbežnej kontroly), ktorá sa označuje ako globálny hodnotiaci faktor (GEF) a vychádza z distribúcie údajov negatívnych kontrol v súvislosti s frekvenciou mutácií zo zúčastnených laboratórií (4). V prípade verzie MLA s využitím agaru je faktor GEF 90×10^{-6} a v prípade verzie MLA s mikrotitračnou metódou je faktor GEF 126×10^{-6}.

63. Za predpokladu, že všetky kritériá prijateľnosti sú splnené, sa testovaná chemikália pokladá za jednoznačne pozitívnu, ak pri ktorejkoľvek z preskúmaných pokusných podmienok (pozri odsek 33) nárast frekvencie mutácií oproti súbežnej hodnote pozadia prekračuje faktor GEF a tento nárast má súvislosť s koncentráciou (napr. na základe testovania trendov). Testovaná chemikália sa vtedy považuje za schopnú vyvolať mutácie v tomto testovacom systéme.

64. Za predpokladu, že všetky kritériá prijateľnosti sú splnené, sa testovaná chemikália pokladá za jednoznačne negatívnu, ak sa pri ktorejkoľvek z preskúmaných pokusných podmienok (pozri odsek 33) nezaznamená reakcia súvisiaca s koncentráciou alebo nedôjde k prekročeniu faktora GEF v prípade nárastu frekvencie mutácií. Testovaná chemikália sa vtedy považuje za neschopnú vyvolať mutácie v tomto testovacom systéme.

TK6

65. Za predpokladu, že všetky kritériá prijateľnosti sú splnené, sa testovaná chemikália pokladá za jasne pozitívnu, ak pre ktorúkoľvek z preskúmaných pokusných podmienok platí, že (pozri odsek 33):

— aspoň jedna z testovaných koncentrácií vykazuje štatisticky významný nárast v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

— ide o nárast, pri ktorom sa pri hodnotení vhodným testovaním trendov potvrdí súvislosť s koncentráciou (pozri odsek 33),

— niektorý z týchto výsledkov je mimo distribúcie historických údajov negatívnych kontrol (napr. mimo 95 % regulačných medzí Poissonovho rozdelenia, pozri odsek 48).

Ak sú splnené všetky tieto kritériá, testovaná chemikália sa považuje za schopnú vyvolať mutácie v tomto testovacom systéme. Odporúčania týkajúce sa najvhodnejších štatistických metód možno nájsť v literatúre (66) (67).

66. Za predpokladu, že všetky kritériá prijateľnosti sú splnené, sa testovaná chemikália pokladá za jasne negatívnu, ak pri všetkých preskúmaných pokusných podmienkach (pozri odsek 33) platí, že:

— ani jedna z testovaných koncentrácií nevykazuje štatisticky významný nárast v porovnaní so súbežnou negatívnou kontrolou,

— hodnotenie pomocou vhodného testovania trendov ukáže, že nedochádza k nárastu v závislosti od koncentrácie,

▼M8

— všetky výsledky sa vyskytujú v rámci distribúcie historických údajov negatívnych kontrol (napr. v rámci 95 % regulačných medzí Poissonovho rozdelenia, pozri odsek 48).

Testovaná chemikália sa vtedy považuje za neschopnú vyvolať mutácie v tomto testovacom systéme.

Pre MLA aj TK6:

67. Ak maximálna koncentrácia vychádza z cytotoxicity, cieľová najvyššia koncentrácia by mala mať hodnotu RTG/RS v rozsahu 20 až 10 %. Existuje zhoda, že pri interpretácii pozitívnych výsledkov, ktoré sa zistili len v rozsahu 20 až 10 % RTG/RS, je potrebné postupovať obozretne a výsledok sa nebude považovať za pozitívny, ak k nárastu frekvencie mutácií došlo len na úrovni 10 % RTG/RS alebo pod ňou (ak sa vyhodnocovala) (2) (59).

68. Existujú určité okolnosti, pri ktorých môžu doplňujúce informácie pomôcť pri stanovení, že testovaná chemikália nie je mutagénna, keď neexistuje žiadna kultúra, ktorá by vykazovala hodnotu RTG v rozsahu 10 až 20 % RTG/RS. Tieto situácie sú vymedzené takto: 1) Neexistuje dôkaz o mutagenite (napr. žiadna závislosť účinku od dávky, žiadne frekvencie mutácií nad úrovňou zaznamenanou v súbežnej negatívnej kontrole alebo historických rozsahoch pozadia atď.) v sérii údajových bodov v rozsahu 100 % až 20 % RTG/RS, pričom existuje aspoň jeden údajový bod v rozsahu 20 až 25 % RTG/RS. 2) Neexistuje dôkaz o mutagenite (napr. žiadna závislosť účinku od dávky, žiadne frekvencie mutácií nad úrovňou zaznamenanou v súbežnej negatívnej kontrole alebo historických rozsahoch pozadia atď.) v sérii údajových bodov v rozsahu 100 % až 25 % RTG/RS, pričom existuje aj negatívny údajový bod mierne pod úrovňou 10 % RTG/RS. V oboch týchto situáciách možno dôjsť k záveru, že testovaná chemikália je negatívna.

69. Neexistuje požiadavka na potvrdenie jednoznačne pozitívnej alebo negatívnej reakcie.

70. V prípade, že reakcia nie je jednoznačne negatívna ani jednoznačne pozitívna podľa uvedeného opisu, a/alebo v prípade, že ide o pomoc pri stanovovaní biologickej relevantnosti výsledku, by sa údaje mali odborne posúdiť a/alebo podrobiť ďalšiemu skúmaniu. Prípadne by mohlo byť užitočné uskutočnenie opakovaného pokusu pomocou zmenených pokusných podmienok [napr. odstup medzi koncentráciami, aby sa zvýšila pravdepodobnosť získania údajových bodov v rozsahu 10 – 20 % RTG/RS, použitie iných podmienok metabolickej aktivácie (t. j. koncentrácia S9 alebo pôvod S9) a trvanie ošetrovania].

71. V zriedkavých prípadoch neumožní súbor údajov ani po ďalšom skúmaní vyvodiť záver o pozitívnom alebo negatívnom výsledku. Reakcia na testovanú chemikáliu sa preto uzavrie ako nejednoznačná (interpretovaná ako s rovnakou pravdepodobnosťou pozitívna alebo negatívna).

SPRÁVA O TESTE

72. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— zdroj, číslo šarže, konečný dátum použitia, ak sú tieto informácie k dispozícii,

— stabilita testovanej chemikálie, ak je známa,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle, ak je známa,

▼**M8**

— prípadné meranie pH, osmolality a zrazeniny v kultivačnom médiu, do ktorého bola pridaná testovaná chemikália.

Jednozložkové látky:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Rozpúšťadlo:

— zdôvodnenie výberu rozpúšťadla,

— percentuálny podiel rozpúšťadla v konečnom kultivačnom médiu.

Bunky:

Pre hlavné laboratórne kultúry:

— typ a zdroj buniek, ako aj história v skúšobnom laboratóriu,

— vlastnosti karyotypu a/alebo modálny počet chromozómov,

— metódy udržiavania bunkových kultúr,

— neprítomnosť mykoplazmy,

— časy zdvojenia buniek.

Podmienky testovania:

— zdôvodnenie výberu koncentrácií a počtu bunkových kultúr vrátane napríklad údajov o cytotoxicite a obmedzení rozpustnosti,

— skladba média, koncentrácia CO_2, úroveň vlhkosti,

— koncentrácia testovanej chemikálie vyjadrená ako konečná koncentrácia v kultivačnom médiu (napr. µg alebo mg/ml alebo mM kultivačného média),

— koncentrácia (a/alebo objem) rozpúšťadla a testovanej chemikálie pridaných do kultivačného média,

— inkubačná teplota,

— inkubačný čas,

— trvanie ošetrenia,

— hustota buniek počas ošetrenia,

▼**M8**

— typ a zloženie systému metabolickej aktivácie (zdroj S9, metóda prípravy zmesi S9, koncentrácia alebo objem zmesi S9 a S9 v konečnom kultivačnom médiu, kontroly kvality S9),

— látky na pozitívnu a negatívnu kontrolu, konečné koncentrácie pre každú z podmienok ošetrenia,

— dĺžka doby expresie (vrátane počtu vysadených buniek, subkultúr a harmonogramov kŕmenia, ak je to vhodné),

— identita selektívneho činidla a jeho koncentrácia,

— v prípade MLA sa uvádza použitá verzia (agar alebo mikrotitračná metóda),

— kritériá prijateľnosti testov,

— metódy použité na stanovenie počtu životaschopných a mutantných buniek,

— metódy použité na meranie cytotoxicity,

— akékoľvek doplňujúce informácie týkajúce sa cytotoxicity a použitej metódy,

— dĺžka inkubačného času po očkovaní,

— vymedzenie kolónií, ktorých veľkosť a typ sa hodnotí (vrátane kritérií na rozlíšenie „malých“ a „veľkých“ kolónií, ak je to vhodné),

— kritériá na považovanie štúdií za pozitívne, negatívne alebo nejednoznačné,

— metódy použité na určenie pH, osmolality (ak sa stanovuje) a zrážania (ak je to relevantné).

Výsledky:

— počet ošetrených buniek a počet subkultivovaných buniek pre jednotlivé kultúry,

— parametre toxicity (RTG v prípade MLA a RS v prípade TK6),

— známky zrážania a čas ich stanovenia,

— počet buniek naočkovaných v selektívnom a neselektívnom médiu,

— počet kolónií v neselektívnom médiu a počet rezistentných kolónií v selektívnom médiu a súvisiace frekvencie mutácií,

— meranie veľkosti kolónií v negatívnych a pozitívnych kontrolách a, ak je testovaná chemikália pozitívna, aspoň pri jednej koncentrácii a súvisiace frekvencie mutácií,

— vzťah medzi koncentráciou a reakciou, ak ho možno určiť,

— údaje o súbežných negatívnych (rozpúšťadlo) a pozitívnych kontrolách (koncentrácie a rozpúšťadlá),

— historické údaje o negatívnych (rozpúšťadlo) a pozitívnych kontrolách (koncentrácie a rozpúšťadlá) obsahujúce rozsahy, stredné hodnoty a štandardné odchýlky; počet testov, z ktorých vyplývajú historické údaje,

▼**M8**

— štatistické analýzy (pre jednotlivé kultúry a spojené paralelné kultúry v odôvodnených prípadoch) a hodnoty p, ak existujú; v prípade MLA vyhodnotenie faktora GEF.

Rozbor výsledkov

Záver

LITERATÚRA

(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, s. 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, s. 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, s. 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. K dispozícii na adrese: [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

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Aneugén: akákoľvek chemikália alebo proces, ktorý pri interakcii so zložkami mitotického alebo meiotického bunkového cyklu vedie k aneuploidii v bunkách alebo organizmoch.

Aneuploidia: akákoľvek odchýlka od bežného diploidného (alebo haploidného) počtu chromozómov vo forme jedného alebo viacerých chromozómov, nie však vo forme celého(-ých) súboru(-ov) chromozómov (polyploidia).

Substitučné mutagény bázového páru: chemikálie, ktoré spôsobujú substitúciu bázových párov v DNA.

Chemikália: látka alebo zmes.

Klonovacia účinnosť: percentuálny podiel buniek naočkovaných s nízkou hustotou, ktoré sú rastom schopné vytvoriť kolóniu, ktorú možno spočítať.

Klastogén: akákoľvek chemikália alebo proces, ktorý spôsobuje štrukturálne chromozómové aberácie v populáciách buniek alebo organizmoch.

Cytotoxicita: v prípade skúšok v rámci tejto testovacej metódy znamená cytotoxicita pokles relatívneho nárastu celkového počtu buniek (RTG) pri skúške MLA, resp. relatívneho prežitia (RS) pri teste TK6.

Priama mutácia: génová mutácia z rodičovského typu na mutantnú formu, ktorá spôsobuje zmenu alebo stratu enzymatickej aktivity alebo funkcie kódovaného proteínu.

Konštrukčné mutagény: chemikálie, ktoré v molekule DNA spôsobujú pridanie alebo vymazanie jedného alebo viacerých bázových párov.

Genotoxický: všeobecný výraz, ktorý zahŕňa všetky typy poškodenia DNA alebo chromozómov vrátane zlomov DNA, aduktov, zmien usporiadania, mutácií, chromozómových aberácií a aneuploidie. Nie všetky typy genotoxických účinkov majú za následok mutácie alebo trvalé poškodenie chromozómov.

Mitotická rekombinácia: rekombinácia medzi homológnymi chromatídami počas mitózy, ktorá môže potenciálne indukovať zlom dvojvláknového reťazca DNA alebo viesť k strate heterozygozity.

Mutagénny: produkujúci dedičnú zmenu sekvencie(-í) párov báz DNA v génoch alebo štruktúry chromozómov (chromozómové aberácie).

Frekvencia mutácií (MF): podiel počtu pozorovaných mutantných buniek a počtu životaschopných buniek.

Čas do prejavenia fenotypu: čas po ošetrení, počas ktorého prebieha genetická zmena v rámci genómu a existujúce génové produkty sa vyčerpajú až do bodu, keď dôjde k zmene fenotypovej charakteristiky.

Relatívne prežitie (RS): na základe relatívneho prežitia sa meria cytotoxicita súvisiaca s ošetrením pri teste TK6. Predstavuje relatívnu klonovaciu účinnosť (CE) buniek naočkovaných bezprostredne po ošetrení pri zohľadnení všetkých strát buniek počas ošetrenia v porovnaní s klonovacou účinnosťou negatívnej kontroly.

▼M8

Relatívny nárast počtu buniek v suspenzii (RSG): v prípade skúšky MLA je to relatívny celkový dvojdňový nárast počtu buniek v suspenzii pri testovacej kultúre v porovnaní s celkovým dvojdňovým nárastom počtu buniek v suspenzii pri negatívnej kontrole/kontrole s aplikáciou rozpúšťadla (Clive and Spector, 1975). RSG zahŕňa relatívny rast testovacej kultúry v porovnaní s negatívnou kontrolou/kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla počas obdobia ošetrenia.

Relatívny nárast celkového počtu buniek (RTG): na základe relatívneho nárastu celkového počtu buniek sa meria cytotoxicita súvisiaca s ošetrením pri skúške MLA. Slúži na meranie relatívneho (vzhľadom na kontrolu s nosičom) rastu testovacích kultúr počas fáz klonovania, ošetrenia, dvojdňovej expresie a mutantnej selekcie v rámci testu. RSG jednotlivých bunkových kultúr sa vynásobí relatívnou klonovacou účinnosťou testovacej kultúry v čase mutantnej selekcie a vyjadrí sa vzhľadom na klonovaciu účinnosť negatívnej kontroly/kontroly s aplikáciou rozpúšťadla (Clive and Spector, 1975).

Frakcie pečene S9: supernatant pečeňového homogenátu po odstredení pri 9 000 g, t. j. surový pečeňový extrakt.

Zmes S9: zmes frakcie pečene S9 a kofaktorov potrebných pre aktivitu metabolických enzýmov.

Nárast počtu buniek v suspenzii (SG): násobné zvýšenie počtu buniek v priebehu fázy ošetrenia a expresie v rámci skúšky MLA. SG sa vypočíta ako súčin násobného zvýšenia na 1. deň a násobného zvýšenia na 2. deň pri krátkom ošetrení (3 alebo 4 hodiny). Ak sa používa 24-hodinové ošetrenie, SG predstavuje súčin násobného zvýšenia počas 24-hodinového ošetrenia a násobných zvýšení na 1. a 2. deň expresie.

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla: všeobecný termín na vymedzenie kontrolných kultúr, ku ktorým sa pridáva len rozpúšťadlo používané na rozpúšťanie testovanej chemikálie.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Neošetrené kontroly: kultúry, ktoré sa neošetrujú (t. j. testovanou chemikáliou ani rozpúšťadlom), ale sa spracovávajú rovnakým spôsobom ako kultúry, ku ktorým sa pridáva testovaná chemikália.

▼M8

Dodatok 2

VZORCE

Cytotoxicita

Pre obe verzie MLA (s využitím agaru aj mikrotitračnej metódy)

Cytotoxicita sa vymedzuje ako relatívny nárast celkového počtu buniek (RTG), ktorý zahŕňa relatívny nárast počtu buniek v suspenzii (RSG) počas dvojdňovej doby expresie a relatívnu klonovaciu účinnosť (RCE) zistenú v čase mutantnej selekcie. Hodnoty RTG, RSG a RCE sú vyjadrené v percentách.

Výpočet RSG: Prvý nárast počtu buniek v suspenzii (SG_1) predstavuje nárast medzi 0. a 1. dňom (koncentrácia buniek na 1. deň/koncentrácia buniek na 0. deň) a druhý nárast počtu buniek v suspenzii (SG_2) predstavuje nárast medzi 1. a 2. dňom (koncentrácia buniek na 2. deň/koncentrácia buniek na 1. deň). RSG predstavuje celkový nárast počtu buniek v suspenzii ($SG_1 \times SG_2$) pri ošetrenej kultúre v porovnaní s neošetrenou kontrolou/kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla. To znamená: RSG = $[SG_{1(test)} \times SG_{2(test)}] / [SG_{1(control)} \times SG_{2(control)}]$ SG_1 sa vypočíta z počiatočnej koncentrácie buniek, ktorá sa použila na začiatku ošetrenia buniek. Týmto sa zohľadňuje akákoľvek diferenciálna cytotoxicita, ktorá sa počas ošetrenia buniek vyskytne v bunkových kultúrach.

RCE je relatívna klonovacia účinnosť testovacej kultúry v porovnaní s relatívnou klonovacou účinnosťou neošetrenej kontroly/kontroly s aplikáciou rozpúšťadla, ktorá sa zistila v čase mutantnej selekcie.

Relatívny nárast celkového počtu buniek (RTG): RTG = RSG × RCE

TK6

Relatívne prežitie (RS):

Cytotoxicita sa hodnotí na základe relatívneho prežitia, t. j. klonovacej účinnosti (CE) buniek naočkovaných bezprostredne po ošetrení pri zohľadnení všetkých strát buniek počas ošetrenia v porovnaní s klonovacou účinnosťou negatívnych kontrol (ktorým je priradená miera prežitia 100 %). Zohľadnenie strát buniek počas ošetrenia možno vypočítať takto:

$$\text{Upravená CE} = \text{CE} \times \frac{\textit{počet buniek na konci ošetrenia}}{\textit{počet buniek na začiatku ošetrenia}}$$

Relatívne prežitie (RS) pre kultúru ošetrenú pomocou testovanej chemikálie sa vypočíta takto:

$$RS = \frac{\textit{upravená CE vošetrenej kultúre}}{\textit{upravená CE vkontrole srozpúšťadlom}} \times 100$$

Frekvencia mutácií pre MLA aj TK6

Frekvencia mutácií (MF) predstavuje klonovaciu účinnosť mutantných kolónií v selektívnom médiu (CE_M) upravenú na základe klonovacej účinnosti v neselektívnom médiu v čase mutantnej selekcie (CE_V). To znamená: MF = CE_M/CE_V. Ďalej sa opisuje výpočet týchto dvoch klonovacích účinností pre metódy klonovania s využitím agaru a mikrotitračnej metódy.

▼**M8**

***Verzia skúšky MLA s využitím agaru**:* V prípade verzie MLA s využitím slabého agaru sa počet kolónií na miske mutantnej selekcie (C_M) a počet kolónií na miske bez selekcie alebo miske na určenie klonovacej účinnosti (počet životaschopných buniek) (C_V) zistia tak, že sa priamo spočítajú klony. Keď sa naočkuje 600 buniek na misky na určenie klonovacej účinnosti (CE) mutantnej selekcie (CE_M) a na misky bez selekcie alebo misky na určenie klonovacej účinnosti (počet životaschopných buniek) (CE_V) a keď sa použije 3×10^6 buniek na účely mutantnej selekcie, potom

$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$

$CE_V = C_V / 600$

Verzia MLA a TK6 s mikrotitračnou metódou: V prípade verzie MLA s mikrotitračnou metódou sa hodnoty C_M a C_V určia ako súčin celkového počtu mikrotitračných jamiek (TW) a pravdepodobného počtu kolónií na jamku (P) na mikrotitračných platničkách.

$C_M = P_M \times TW_M$

$C_V = P_V \times TW_V$

Na základe Poissonovho rozdelenia v nulovom bode (Furth a kol., 1981) sa P určuje ako

$P = - \ln (EW/TW)$

keď EW predstavuje počet prázdnych jamiek a TW celkový počet jamiek. Preto:

$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$

$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$

V prípade verzie MLA s mikrotitračnou metódou sa frekvencie mutácií malých a veľkých kolónií vypočítajú rovnakým spôsobom s využitím príslušného počtu prázdnych jamiek pre malé a veľké kolónie.

Pri teste TK6 sa frekvencie mutácií malých a veľkých kolónií stanovia na základe skoro vznikajúcich a neskoro vznikajúcich mutantov.

▼M8

B.68. **TESTOVACIA METÓDA KRÁTKODOBEJ EXPOZÍCIE IN VITRO NA IDENTIFIKÁCIU i) CHEMIKÁLIÍ VYVOLÁVAJÚCICH VÁŽNE POŠKODENIE OČÍ A ii) CHEMIKÁLIÍ, KTORÉ SI NEVYŽADUJÚ KLASIFIKÁCIU AKO CHEMIKÁLIE SPÔSOBUJÚCE PODRÁŽDENIE OČÍ ALEBO VÁŽNE POŠKODENIE OČÍ**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda (TM) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 491 (2017). Testovacia metóda krátkodobej expozície (Short Time Exposure – STE) je metóda *in vitro*, ktorú možno za určitých okolností a pri zohľadnení špecifických obmedzení použiť na klasifikáciu nebezpečnosti a označovanie chemikálií (látok a zmesí), ktoré vyvolávajú vážne poškodenie očí, ako aj tých, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce vážne poškodenie očí alebo podráždenie očí, ako sa to vymedzuje v Globálnom harmonizovanom systéme klasifikácie a označovania chemikálií Organizácie Spojených národov (GHS OSN) (1) a nariadení Európskej únie (EÚ) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (CLP) ([1]).

2. Potenciál nebezpečnosti chemikálií pre oči sa počas mnohých rokov hodnotil hlavne pomocou očného testu *in vivo* na králikoch [testovacia metóda B.5 (8), rovnocenná s usmernením OECD TG 405]. Vo všeobecnosti sa uznáva, že v dohľadnej budúcnosti nedokáže žiaden jednotlivý alternatívny test *in vitro* úplne nahradiť očný test *in vivo* na králikoch na účely predikcie úplného rozsahu reakcií, ktoré sa prejavujú vážnym poškodením očí/podráždením očí, pre rôzne triedy chemikálií. Očný test na králikoch však možno dokážu plne nahradiť strategické kombinácie alternatívnych testovacích metód použitých v rámci (viacúrovňovej) testovacej stratégie (2). Prístup zhora nadol je určený na testovanie chemikálií, pri ktorých na základe existujúcich informácií možno očakávať, že majú vysoký potenciál dráždivosti alebo vyvolávajú vážne poškodenie očí. Naopak, prístup zdola nahor je určený na testovanie chemikálií, pri ktorých na základe existujúcich informácií možno očakávať, že nespôsobujú podráždenie očí v takej miere, aby sa pri nich vyžadovala príslušná klasifikácia. Hoci sa testovacia metóda STE nepovažuje za úplnú náhradu očného testu *in vivo* na králikoch, jej použitie je vhodné ako súčasť viacúrovňovej testovacej stratégie regulačnej klasifikácie a označovania, napríklad v rámci prístupu zhora nadol/zdola nahor, s cieľom bez ďalšieho testovania identifikovať i) chemikálie vyvolávajúce vážne poškodenie očí (kategória 1 podľa GHS OSN/CLP) a ii) chemikálie (s výnimkou vysoko prchavých látok a všetkých tuhých chemikálií okrem povrchovo aktívnych látok), ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí („bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP) (1) (2). No v prípade chemikálie, pri ktorej sa na základe testovacej metódy STE nepredpokladá, že spôsobuje vážne poškodenie očí (kategória 1 podľa GHS OSN/CLP), ani to, že bude označená ako „bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP (čo znamená, že nevyvoláva vážne poškodenie ani podráždenie očí), sa vyžaduje doplňujúce testovanie na určenie konečnej klasifikácie. Okrem toho je pred použitím testovacej metódy STE v rámci prístupu zdola nahor podľa iných klasifikačných schém než GHS OSN/CLP potrebné sa obrátiť na príslušné regulačné orgány. Výber najvhodnejšej testovacej metódy a jej použitie je potrebné posudzovať v kontexte usmerňovacieho dokumentu OECD o integrovaných prístupoch k testovaniu a hodnoteniu v prípade vážneho poškodenia očí a podráždenia očí (14).

3. Účelom tejto testovacej metódy je opísať postupy používané na hodnotenie potenciálu testovanej chemikálie predstavovať nebezpečnosť pre oči, a to na základe jej schopnosti vyvolať cytotoxicitu v testovacej metóde krátkodobej expozície. Cytotoxický účinok chemikálií na bunky rohovkového epitelu

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006, Ú. v. EÚ L 353/1, 31.12.2008.

▼**M8**

predstavuje významný spôsob účinku (MOA), ktorý vedie k poškodeniu rohovkového epitelu a podráždeniu oka. Životaschopnosť buniek sa v rámci testovacej metódy STE posudzuje kvantitatívnym meraním modrej formazánovej soli po jej extrakcii z buniek, pričom túto soľ vytvárajú živé bunky enzymatickou konverziou vitálneho farbiva MTT [2,5-difenyl-3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)tetrazólium-bromid)], ktoré sa označuje aj ako tiazolylová modrá tetrazólium-bromid (3). Zistená životaschopnosť buniek sa porovnáva s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla (relatívna životaschopnosť) a slúži na odhad potenciálu testovanej chemikálie predstavovať nebezpečnosť pre oči. Testovaná chemikália na základe klasifikácie patrí do kategórie 1 podľa GHS OSN/CLP, keď sa pri koncentráciách 5 % aj 0,05 % zistí životaschopnosť buniek, ktorá je nižšia ako alebo sa rovná (≤) 70 %. Naopak, pri testovanej chemikálii sa predpokladá, že podľa GHS OSN/CLP sa na ňu vzťahuje označenie „bez kategórie“, keď sa pri koncentráciách 5 % aj 0,05 % zistí životaschopnosť buniek vyššia ako (>) 70 %.

4. Pojem „testovaná chemikália“ sa v tejto testovacej metóde používa na označenie toho, čo sa testuje, a netýka sa použiteľnosti testovacej metódy STE na testovanie látok a/alebo zmesí. Vymedzenie pojmov sa uvádza v dodatku.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

5. Táto testovacia metóda je založená na protokole, ktorý vytvorila spoločnosť Kao Corporation (4) a ktorý bol predmetom dvoch odlišných validačných štúdií: jednu uskutočnila organizácia JSAAE (Validation Committee of the Japanese Society for Alternative to Animal Experiments) (5) a druhú organizácia JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) (6). Partnerské preskúmanie uskutočnili organizácie NICEATM/ICCVAM na základe správ o validačných štúdiách a podkladových kontrolných dokumentov k testovacej metóde (7).

6. Pri použití na identifikovanie chemikálií (látok a zmesí) vyvolávajúcich vážne poškodenie očí [kategória 1 podľa GHS OSN/CLP (1)] sa pri údajoch získaných pomocou testovacej metódy STE na 125 chemikáliách (vrátane látok aj zmesí) preukázala celková presnosť 83 % (104/125), miera falošnej pozitivity 1 % (1/86) a miera falošnej negativity 51 % (20/39) v porovnaní s očným testom *in vivo* na králikoch (7). V tomto kontexte nie je miera falošnej negativity kritická, keďže všetky testované chemikálie, pri ktorých je životaschopnosť buniek ≤ 70 % pri koncentrácii 5 % a > 70 % pri koncentrácii 0,05 %, by sa následne testovali pomocou iných riadne validovaných testovacích metód *in vitro* alebo, ako posledná možnosť, pomocou očného testu *in vivo* na králikoch v závislosti od regulatórnych požiadaviek a v súlade so stratégiou postupného testovania a s prístupmi založenými na analýze váhy dôkazov, ktoré sa v súčasnosti odporúčajú (1) (8). Testovali sa najmä jednozložkové látky, existuje však aj obmedzené množstvo údajov o testovaní zmesí. Táto testovacia metóda je napriek tomu technicky použiteľná aj na testovanie viaczložkových látok a zmesí. Pred použitím tejto testovacej metódy na zmesi s cieľom generovať údaje plánované na regulačné účely by sa však malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na tento účel, a ak áno, tak prečo. Takéto úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi. Pri použití testovacej metódy STE na identifikáciu testovaných chemikálií zodpovedajúcich kategórii 1 podľa GHS OSN/CLP sa neprejavili žiadne iné špecifické nedostatky. Skúšajúci môžu zvážiť použitie tejto testovacej metódy pri testovaných chemikáliách, pričom by sa životaschopnosť buniek ≤ 70 % pri koncentráciách 5 % aj 0,05 % mala považovať za prejav reakcie, ktorá vyvoláva vážne poškodenie očí, pri ktorej sa bez ďalšieho testovania vyžaduje klasifikácia podľa kategórie 1 GHS OSN/CLP.

▼**M8**

7. Pri použití na identifikovanie chemikálií (látok a zmesí), ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí (t. j. „bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP), sa pri údajoch získaných pomocou testovacej metódy STE na 130 chemikáliách (vrátane látok aj zmesí) preukázala celková presnosť 85 % (110/130), miera falošnej negativity 12 % (9/73) a miera falošnej pozitivity 19 % (11/57) v porovnaní s očným testom *in vivo* na králikoch (7). Ak sa z množiny údajov vylúčia vysoko prchavé látky a tuhé látky okrem povrchovo aktívnych látok, dosiahne sa zlepšenie, pri ktorom je celková presnosť 90 % (92/102), miera falošnej negativity 2 % (1/54) a miera falošnej pozitivity 19 % (9/48) (7). V dôsledku toho medzi potenciálne nedostatky testovacej metódy STE pri použití na identifikovanie testovaných chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí („bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP), patrí vysoká miera falošnej negativity pri i) vysoko prchavých látkach s tlakom pár presahujúcim 6 kPa a ii) tuhých chemikáliách (látkach a zmesiach) okrem povrchovo aktívnych látok a zmesí zložených len z povrchovo aktívnych látok. Tieto látky sú vylúčené z oblasti použiteľnosti testovacej metódy STE (7).

8. Okrem chemikálií uvedených v odsekoch 6 a 7 obsahuje množina údajov vytvorená pomocou testovacej metódy STE aj vlastné údaje pre 40 zmesí, pri ktorých sa pri porovnaní s Draizovým očným testom *in vivo* preukázala presnosť 88 % (35/40), miera falošnej pozitivity 50 % (5/10) a miera falošnej negativity 0 % (0/30) pri predikcii zmesí, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu na základe systémov klasifikácie GHS OSN/CLP (9). Testovaciu metódu STE preto možno použiť pri prístupe zdola nahor na identifikovanie zmesí spĺňajúcich podmienky označenia „bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP, s výnimkou tuhých zmesí okrem tých, ktoré sú zložené len z povrchovo aktívnych látok, čo predstavuje rozšírenie jej obmedzenia na tuhé látky. Okrem toho je potrebné postupovať obozretne pri hodnotení zmesí, ktoré obsahujú látky s tlakom pár vyšším ako 6 kPa, aby sa predišlo potenciálnemu podhodnoteniu predpokladu, a primeranosť ich testovania by mala byť individuálne preukázaná v jednotlivých prípadoch.

9. Testovaciu metódu STE nemožno použiť na identifikáciu testovaných chemikálií zodpovedajúcich kategórii 2 podľa GHS OSN/CLP, ani zodpovedajúcich kategórii 2A (podráždenie očí) alebo 2B (mierne podráždenie očí) podľa GHS OSN, a to vzhľadom na značný počet chemikálií zodpovedajúcich kategórii 1 podľa GHS OSN/CLP, ktoré boli na základe podhodnotených predpokladov zaradené do kategórie 2, 2A alebo 2B, ako aj chemikálií „bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP, ktoré boli na základe nadhodnotených predpokladov zaradené do kategórie 2, 2A alebo 2B (7). Na tento účel sa môže vyžadovať ďalšie testovanie pomocou inej vhodnej metódy.

10. Testovacia metóda STE je vhodná pre testované chemikálie, ktoré možno rozpustiť alebo rovnomerne rozmiešať najmenej na päť minút vo fyziologickom roztoku, v 5 % dimetylsulfoxide (DMSO) vo fyziologickom roztoku alebo v minerálnom oleji. Testovacia metóda STE nie je vhodná pre testované chemikálie, ktoré sú nerozpustné alebo ktoré nemožno rovnomerne rozmiešať najmenej na päť minút vo fyziologickom roztoku, v 5 % DMSO vo fyziologickom roztoku alebo v minerálnom oleji. Vzhľadom na krátkodobú expozíciu možno pri testovacej metóde STE použiť minerálny olej. Testovacia metóda STE je vhodná na predikciu potenciálu nebezpečnosti pre oči v prípade testovaných chemikálií nerozpustných vo vode (napr. mastné alkoholy s dlhým reťazcom alebo ketóny) za predpokladu, že sú miešateľné aspoň s jedným z troch vyššie uvedených rozpúšťadiel (4).

▼M8

11. Pojem „testovaná chemikália“ sa v tejto testovacej metóde používa na označenie toho, čo sa testuje ([1]), a netýka sa použiteľnosti testovacej metódy STE na testovanie látok a/alebo zmesí.

PRINCÍP TESTU

12. Testovacia metóda STE je skúška *in vitro* založená na cytotoxicite, ktorá sa uskutočňuje na konfluentnej jednovrstvovej bunkovej kultúre buniek rohovky králikov inštitútu Statens Seruminstitut (SIRC), ktoré sa kultivujú na 96-jamkovej polykarbonátovej mikrotitračnej platničke (4). Po päťminútovej expozícii testovanej chemikálii sa cytotoxicita kvantitatívne meria ako relatívna životaschopnosť buniek SIRC pomocou skúšky MTT (4). Znížená životaschopnosť buniek slúži na predikciu potenciálnych nežiaducich účinkov, ktoré vedú k poškodeniu očí.

13. Uvádza sa, že 80 % roztoku, ktorý sa kvapne do oka králika, sa vylúči cez spojovkový vak do troch až štyroch minút, zatiaľ čo viac než 80 % roztoku, ktorý sa kvapne do ľudského oka, sa vylúči cez spojovkový vak do jednej až dvoch minút (10). Zámerom testovacej metódy STE je dosiahnuť aproximáciu týchto časov expozície a využiť cytotoxicitu ako sledovaný parameter na posúdenie rozsahu poškodenia buniek SIRC po päťminútovej expozícii testovanej chemikálii.

PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

14. Je potrebné, aby laboratóriá pred začatím bežného používania testovacej metódy STE, ktorá sa tu opisuje, preukázali technickú spôsobilosť tak, že správne klasifikujú jedenásť látok odporúčaných v tabuľke 1. Tieto látky boli zvolené tak, aby reprezentovali úplný rozsah reakcií z hľadiska vážneho poškodenia očí alebo podráždenia očí na základe výsledkov očných testov *in vivo* na králikoch (TG 405) a systému klasifikácie GHS OSN/CLP (1). Medzi ďalšie výberové kritériá patrilo to, aby boli látky komerčne dostupné, aby boli dostupné referenčné údaje *in vivo* s vysokou kvalitou a aby boli dostupné údaje *in vitro* s vysokou kvalitou z testovacej metódy STE (3). V situáciách, keď uvedená látka nie je k dispozícii, alebo v odôvodnených prípadoch možno použiť inú látku, pre ktorú sú dostupné primerané referenčné údaje *in vivo* a *in vitro*, za predpokladu, že sa uplatňujú rovnaké kritériá, aké sú opísané na tomto mieste.

Tabuľka 1

Zoznam látok na preukázanie spôsobilosti

Látka	Registračné číslo CAS	Chemická trieda ([1])	Skupenstvo	Kategória GHS OSN/CLP v teste *in vivo* ([2])	Rozpúšťadlo v teste STE	Kategória GHS OSN/CLP v teste STE
benzalkónium-chlorid (10 %, vodný)	8001-54-5	óniová zlúčenina	kvapalné	kategória 1	fyziologický roztok	kategória 1
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	éter	kvapalné	kategória 1	fyziologický roztok	kategória 1

([1]) V júni 2013 sa na spoločnom zasadnutí dospelo k dohode, že tam, kde je to možné, sa bude v nových a aktualizovaných testovacích metódach na opis toho, čo sa testuje, jednotnejšie uplatňovať pojem „testovaná chemikália“.

▼**M8**

Látka	Registračné číslo CAS	Chemická trieda ([1])	Skupenstvo	Kategória GHS OSN/CLP v teste *in vivo* ([2])	Rozpúšťadlo v teste STE	Kategória GHS OSN/CLP v teste STE
kyslá červeň 92	18472-87-2	heterocyklická zlúčenina; brómová zlúčenina; chlórová zlúčenina	tuhé	kategória 1	fyziologický roztok	kategória 1
hydroxid sodný	1310-73-2	alkália; anorganická chemikália	tuhé	kategória 1 ([3])	fyziologický roztok	kategória 1
butyrolaktón	96-48-0	laktón; heterocyklická zlúčenina	kvapalné	kategória 2A (kategória 2 v CLP)	fyziologický roztok	predpoklad nie je možný
1-oktanol	111-87-5	alkohol	kvapalné	kategória 2A/B ([4]) (kategória 2 v CLP)	minerálny olej	predpoklad nie je možný
cyklopentanol	96-41-3	alkohol; uhľovodík, cyklický	kvapalné	kategória 2A/B ([5]) (kategória 2 v CLP)	fyziologický roztok	predpoklad nie je možný
(2-etoxyetyl)-acetát	111-15-9	alkohol; éter	kvapalné	bez kategórie	fyziologický roztok	bez kategórie
dodekán	112-40-3	uhľovodík, acyklický	kvapalné	bez kategórie	minerálny olej	bez kategórie
metylizobutylketón	108-10-1	ketón	kvapalné	bez kategórie	minerálny olej	bez kategórie

▼M8

Látka	Registračné číslo CAS	Chemická trieda ([1])	Skupenstvo	Kategória GHS OSN/CLP v teste *in vivo* ([2])	Rozpúšťadlo v teste STE	Kategória GHS OSN/CLP v teste STE
1,1-dimetylguanidín sulfát	598-65-2	amidín; zlúčenina síry	tuhé	bez kategórie	fyziologický roztok	bez kategórie

([1]) Chemické triedy boli priradené na základe informácií získaných z predchádzajúcich publikácií organizácie NICEATM a v prípade, že neboli dostupné, na základe systému Medical Subject Headings inštitútu National Library of Medicine (MeSH®) [prostredníctvom služby ChemIDplus® (National Library of Medicine), k dispozícii na adrese http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/] a štruktúrnych stanovení uskutočnených organizáciou NICEATM.

([2]) Na základe výsledkov očného testu *in vivo* na králikoch (OECD TG 405) a s použitím GHS OSN/CLP (1).

([3]) Klasifikácia v kategórii 1 je založená na potenciáli 100 % hydroxidu sodného spôsobiť poleptanie kože (hydroxid sodný sa uvádza ako chemikália na preukázanie spôsobilosti s potenciálom spôsobiť poleptanie kože v usmernení OECD TG 435) a na kritériu pre kategóriu 1 podľa GHS OSN/CLP (1).

([4]) Klasifikácia v kategóriách 2A alebo 2B závisí od interpretácie kritéria GHS OSN na rozlišovanie medzi týmito dvoma kategóriami, t. j. 2 zo 6, resp. 4 zo 6 zvierat s účinkami na 7. deň ako podmienka na klasifikáciu v kategórii 2A. Množina údajov *in vivo* zahŕňala 2 štúdie, pričom v každej boli 3 zvieratá. V jednej štúdii sa na 7. deň pri dvoch z troch zvierat prejavil účinok, na základe čoho sa vyžaduje klasifikácia v kategórii 2A (11), zatiaľ čo v druhej štúdii sa všetky sledované parametre pri všetkých troch zvieratách do 7. dňa vrátili na nulovú hodnotu, na základe čoho sa vyžaduje klasifikácia v kategórii 2B (12).

([5]) Klasifikácia v kategóriách 2A alebo 2B závisí od interpretácie kritéria GHS OSN na rozlišovanie medzi týmito dvoma kategóriami, t. j. 1 z 3, resp. 2 z 3 zvierat s účinkami na 7. deň ako podmienka na klasifikáciu v kategórii 2A. Do štúdie *in vivo* boli zahrnuté 3 zvieratá. Všetky sledované parametre, s výnimkou zákalu rohovky a začervenania spojoviek v prípade jedného zvieraťa, sa do 7. dňa alebo skôr vrátili na nulovú hodnotu. Toto jedno zviera, ktoré sa do 7. dňa v plnej miere nezotavilo, vykazovalo (na 7. deň) zákal rohovky s hodnotou 1 a začervenanie spojoviek s hodnotou 1, ktoré sa na 14. deň vrátili na pôvodnú hodnotu (11).

Skratky: Registračné číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service)

POSTUP

Príprava jednovrstvovej bunkovej kultúry

15. Na vykonanie testovacej metódy STE sa používa bunková línia rohovky králikov SIRC. Odporúča sa, aby sa bunky SIRC získali z riadne kvalifikovanej bunkovej banky, ako je napríklad CCL60 organizácie ATCC (American Type Culture Collection).

16. Bunky SIRC sa kultivujú pri teplote 37 °C v atmosfére s vyššou relatívnou vlhkosťou a 5 % CO_2 v kultivačnej banke, ktorá obsahuje kultivačné médium zložené z minimálneho základného média podľa Eagla (MEM) s pridaním 10 % bovinného fetálneho séra (FBS), 2 mM L-glutamínu, 50 – 100 jednotiek/ml penicilínu a 50 – 100 µg/ml streptomycínu. Bunky, pri ktorých v kultivačnej banke nastala konfluencia, sa oddelia pomocou roztoku trypsínu a kyseliny etyléndiamíntetraoctovej s použitím alebo bez použitia škrabky na bunky. Pred použitím na bežné testovanie sa bunky namnožia (napr. 2 až 3 pasáže) v kultivačnej banke, pričom od rozmrazenia nemá prebehnúť viac ako 25 pasáží.

17. Bunky, ktoré sú pripravené na použitie v teste STE, sa následne pripravia s príslušnou hustotou a nasadia sa do 96-jamkových mikrotitračných platničiek. Odporúčaná hustota buniek pri nasadení je $6{,}0 \times 10^3$ buniek na jamku, keď sa bunky použijú štyri dni po nasadení, alebo $3{,}0 \times 10^3$ buniek na jamku, keď sa bunky použijú päť dní po nasadení, pričom objem kultúr je 200 µl. Bunky používané na test STE, ktoré sa nasadia do kultivačného média s vhodnou hustotou, dosiahnu viac ako 80 % konfluenciu v čase testovania, t. j. štyri alebo päť dní po nasadení.

Aplikácia testovaných chemikálií a kontrolných látok

18. Prvú voľbu pri výbere rozpúšťadla na rozpustenie alebo rozmiešanie testovaných chemikálií predstavuje fyziologický roztok. Ak má testovaná chemikália nízku rozpustnosť alebo ju nemožno rozpustiť alebo rovnomerne rozmiešať najmenej na päť minút vo fyziologickom roztoku, ako druhá

▼M8

možnosť sa pri výbere rozpúšťadla použije 5 % DMSO (registračné číslo CAS 67-68-5) vo fyziologickom roztoku. V prípade testovaných chemikálií, ktoré nemožno rozpustiť ani rovnomerne rozmiešať najmenej na päť minút ani vo fyziologickom roztoku, ani v 5 % DMSO vo fyziologickom roztoku, sa ako tretia možnosť pri výbere rozpúšťadla použije minerálny olej (registračné číslo CAS 8042-47-5).

19. Testované chemikálie sa rozpustia alebo rovnomerne rozmiešajú vo zvolenom rozpúšťadle pri koncentrácii 5 hm. % a ďalej sa riedia sériovým 10-násobným riedením na koncentrácie 0,5 % a 0,05 %. Každá testovaná chemikália sa testuje pri koncentráciách 5 % aj 0,05 %. Bunky kultivované v 96-jamkovej mikrotitračnej platničke sa vystavia roztoku (alebo suspenzii) testovanej chemikálie s koncentráciou 5 % alebo 0,05 % v objeme 200 µl/jamka na päť minút pri izbovej teplote. Testované chemikálie (jednozložkové látky alebo viaczložkové látky alebo zmesi) sa považujú za látky v čistom stave a podľa príslušnej metódy sa riedia alebo rozmiešajú bez ohľadu na svoju čistotu.

20. Kultivačné médium opísané v odseku 16 sa používa ako kontrola s médiom na jednotlivých platničkách pri každom opakovaní. Bunky sa okrem toho vystavia aj vzorkám kontroly s aplikáciou rozpúšťadla na každej platničke pri každom opakovaní. V prípade rozpúšťadiel uvedených v odseku 18 sa potvrdilo, že nemajú nežiaduce účinky na životaschopnosť buniek SIRC.

21. V testovacej metóde STE sa na jednotlivých platničkách pri každom opakovaní ako pozitívna kontrola použije 0,01 % laurylsulfátu sodného (SLS) vo fyziologickom roztoku. S cieľom vypočítať životaschopnosť buniek pozitívnej kontroly sa na každej platničke pri každom opakovaní musí nachádzať aj kontrola s aplikáciou fyziologického roztoku ako rozpúšťadla.

22. Vyžaduje sa slepý pokus na určenie kompenzácie optickej hustoty, ktorý je potrebné vykonať na jamkách obsahujúcich len fosfátový tlmivý fyziologický roztok, nie však vápnik a horčík (PBS-) alebo bunky.

23. Každá vzorka (testovaná chemikália s koncentráciou 5 % a 0,05 %, kontrola s médiom, kontrola s aplikáciou rozpúšťadla a pozitívna kontrola) sa testuje pri každom opakovaní trojmo tak, že sa bunky počas piatich minút pri izbovej teplote vystavia 200 µl príslušnej testovanej alebo kontrolnej chemikálie.

24. Referenčné látky sú užitočné na posudzovanie potenciálu neznámych chemikálií určitých chemických tried alebo tried výrobkov spôsobovať očné podráždenie alebo na posudzovanie relatívneho dráždivého potenciálu očnej dráždivej látky v určitom rozsahu reakcií na dráždivý podnet.

Meranie životaschopnosti buniek

25. Po expozícii sa bunky dvakrát premyjú 200 µl roztoku PBS a pridá sa 200 µl roztoku MTT (0,5 mg MTT/ml kultivačného média). Po dvojhodinovom čase reakcie v inkubátore (37 °C, 5 % CO_2) sa roztok MTT dekantuje, formazán MTT sa extrahuje pridaním 200 µl roztoku 0,04 N kyseliny chlorovodíkovej v izopropanole počas 60 minút v tme pri izbovej teplote a zmeria sa absorbancia roztoku formazánu MTT pri vlnovej dĺžke 570 nm pomocou vyhodnocovača mikrotitračných platničiek. K interferencii testovaných chemikálií so skúškou MTT (prostredníctvom farbív alebo priamych redukčných činidiel MTT) dochádza, len ak po prepláchnutí po expozícii zostane v testovacom systéme významné množstvo testovanej chemikálie, k čomu môže dôjsť v prípade tkanív 3D rekonštruovanej ľudskej rohovky alebo rekonštruovanej ľudskej epidermy, nie je to však relevantné pre 2D bunkové kultúry, ktoré sa používajú pri testovacej metóde STE.

▼M8

Interpretácia výsledkov a prognostický model

26. Hodnoty optickej hustoty (OD) získané pre každú testovanú chemikáliu sa následne použijú na výpočet životaschopnosti buniek vzhľadom na kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla, ktorá predstavuje úroveň 100 %. Relatívna životaschopnosť buniek sa vyjadruje v percentách a určí sa ako podiel OD testovanej chemikálie a OD kontroly s aplikáciou rozpúšťadla po tom, ako sa od oboch hodnôt odpočíta OD slepého pokusu.

$$Životaschop.buniek(\%) = \frac{(OD_{570}\ testovanej\ chemikálie) - (OD_{570}\ slepého\ pokusu)}{(OD_{570}\ kontroly\ srozpúšťadlom) - (OD_{570}\ slepého\ pokusu)} \times 100$$

Podobne sa relatívna životaschopnosť každej kontroly s aplikáciou rozpúšťadla vyjadruje v percentách a určí sa ako podiel OD každej kontroly s aplikáciou rozpúšťadla a OD kontroly s médiom po tom, ako sa od oboch hodnôt odpočíta OD slepého pokusu.

27. Je potrebné uskutočniť tri nezávislé opakovania, pričom každé obsahuje tri replikované jamky (t. j. n = 9). Aritmetický priemer týchto troch jamiek pre každú testovanú chemikáliu a kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla v každom nezávislom opakovaní sa použije na výpočet aritmetického priemeru relatívnej životaschopnosti buniek. Konečný aritmetický priemer životaschopnosti buniek sa vypočíta z troch nezávislých opakovaní.

28. Ďalej sa uvádzajú hraničné hodnoty životaschopnosti buniek na identifikáciu testovaných chemikálií, ktoré vyvolávajú vážne poškodenie očí (kategória 1 podľa GHS OSN/CLP), a testovaných chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí („bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP).

Tabuľka 2

Prognostický model testovacej metódy STE

Životaschopnosť buniek		Klasifikácia podľa GHS OSN/CLP	Uplatniteľnosť
Pri 5 %	Pri 0,05 %		
< 70 %	< 70 %	bez kategórie	látky a zmesi, s výnimkou: i) vysoko prchavých látok s tlakom pár presahujúcim 6 kPa ([1]) a ii) tuhých chemikálií (látok a zmesí) okrem povrchovo aktívnych látok a zmesí zložených len z povrchovo aktívnych látok
≤ 70 %	< 70 %	predpoklad nie je možný	neuplatňuje sa
≤ 70 %	≤ 70 %	kategória 1	látky a zmesi ([2])

([1]) Je potrebné postupovať obozretne pri hodnotení zmesí, ktoré obsahujú látky s tlakom pár vyšším ako 6 kPa, aby sa predišlo potenciálnemu podhodnoteniu predpokladu, a primeranosť ich testovania by mala byť individuálne preukázaná v jednotlivých prípadoch.

([2]) Na základe výsledkov získaných hlavne z jednozložkových látok. Existuje však aj obmedzené množstvo údajov na základe testovania zmesí. Táto testovacia metóda je napriek tomu technicky použiteľná aj na testovanie viaczložkových látok a zmesí. Pred použitím tejto testovacej metódy na zmesi s cieľom generovať údaje plánované na regulačné účely by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na tento účel, a ak áno, tak prečo. Takéto úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi.

▼M8

Kritériá prijateľnosti

29. Výsledky testov sa považujú za prijateľné, keď sú splnené všetky tieto kritériá:

a) Optická hustota kontroly s médiom (vystavenej kultivačnému médiu) má byť po odpočítaní optickej hustoty slepého pokusu 0,3 alebo vyššia.

b) Životaschopnosť kontroly s aplikáciou rozpúšťadla má byť vzhľadom na kontrolu s médiom 80 % alebo vyššia. Ak sa pri každom opakovaní použijú viaceré kontroly s aplikáciou rozpúšťadla, pri každej z týchto kontrol sa má preukázať životaschopnosť buniek vyššia ako 80 %, aby testované chemikálie, ktoré sa testovali s týmito rozpúšťadlami, vyhoveli požiadavkám.

c) Životaschopnosť buniek zistená pri pozitívnej kontrole (0,01 % SLS) má byť v rozsahu dvoch štandardných odchýlok voči historickej strednej hodnote. Horné a dolné hranice prijateľnosti pre pozitívnu kontrolu sa majú aktualizovať v častých intervaloch, t. j. každé tri mesiace, alebo v prípade laboratórií, v ktorých sa testy vykonávajú zriedkavo (t. j. menej ako raz mesačne), vždy, keď sa v nich uskutoční prijateľný test. V prípade, že laboratórium neuskutočňuje dostatočný počet pokusov na vytvorenie štatisticky spoľahlivej distribúcie pozitívnych kontrol, je prijateľné použiť hornú a dolnú hranicu prijateľnosti, ktorú určil autor metódy, t. j. 21,1 % až 62,3 % podľa jeho historických laboratórnych údajov, kým sa počas prvých bežných testov nevygenerujú interné údaje o distribúcii.

d) Štandardná odchýlka konečnej životaschopnosti buniek odvodenej od troch nezávislých opakovaní má byť menšia ako 15 % pre koncentrácie testovanej chemikálie 5 % aj 0,05 %.

Ak jedno alebo viaceré z týchto kritérií nebudú splnené, výsledky sa zrušia a je potrebné uskutočniť ďalšie tri nezávislé opakovania.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje

30. Je potrebné uvádzať údaje pre každú jednotlivú jamku (napr. hodnoty životaschopnosti buniek) každého opakovania, ako aj celkovú strednú hodnotu, SD a klasifikáciu.

Správa o teste

31. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália a kontrolné látky

— jednozložkové látky: identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, registračné čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— viaczložkové látky, UVCB a zmesi: čo najpodrobnejšia charakterizácia, napr. prostredníctvom chemickej identity (pozri vyššie), čistoty, kvantitatívneho výskytu a relevantných fyzikálno-chemických vlastností (pozri vyššie) zložiek v dostupnom rozsahu,

— skupenstvo, prchavosť, pH, koeficient LogP, molekulová hmotnosť, chemická trieda a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti súvisiace s uskutočňovaním štúdie v dostupnom rozsahu,

▼**M8**

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu.

Podmienky a postupy testovacej metódy

— meno a adresa objednávateľa, testovacieho zariadenia a vedúceho štúdie,

— opis použitej testovacej metódy,

— použitá bunková línia, jej zdroj, počet pasáží a konfluencia buniek použitých na testovanie,

— podrobnosti o použitom testovacom postupe,

— počet opakovaní a použitých replikátov,

— použité koncentrácie testovaných chemikálií (ak sa líšia od odporúčaných koncentrácií),

— zdôvodnenie výberu rozpúšťadla pre každú testovanú chemikáliu,

— trvanie expozície testovanej chemikálii (ak sa líši od odporúčaného trvania),

— opis všetkých modifikácií testovacieho postupu,

— opis použitých kritérií hodnotenia a rozhodovania,

— odkaz na historickú strednú hodnotu pozitívnych kontrol a štandardnú odchýlku,

— preukázanie spôsobilosti laboratória pri uskutočňovaní testovacej metódy (napr. testovaním látky na preukázanie spôsobilosti) alebo preukázanie reprodukovateľného vykonávania testovacej metódy v priebehu času.

Výsledky

— pre každú testovanú chemikáliu a kontrolnú látku, ako aj jednotlivé testované koncentrácie sa v tabuľkovej podobe uvádzajú individuálne hodnoty OD na každú replikovanú jamku, hodnoty aritmetického priemeru OD pre každé nezávislé opakovanie, percentuálna hodnota životaschopnosti buniek pre každé nezávislé opakovanie a konečný aritmetický priemer percentuálnych hodnôt životaschopnosti buniek a SD za tri opakovania,

— výsledky pre médium, rozpúšťadlo a pozitívnu kontrolu preukazujúce vhodné akceptačné kritériá štúdie,

— opis ďalších pozorovaných účinkov,

— celková odvodená klasifikácia s prihliadnutím na použitý prognostický model/rozhodovacie kritériá.

▼**M8**

Diskusia o výsledkoch

Záver

LITERATÚRA

(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. K dispozícii na adrese: 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, s. 1855-1869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. K dispozícii na adrese: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Kapitola B.5 tejto prílohy, Akútne podráždenie/poleptanie oka

(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

Dodatok

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o mieru výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (13).

Referenčná látka: látka, ktorá sa používa ako štandard na porovnávanie s testovanou chemikáliou. Referenčná látka by mala mať tieto vlastnosti: i) konzistentné a spoľahlivé zdroje; ii) štruktúrnu a funkčnú podobnosť s triedou testovaných látok; iii) známe fyzikálno-chemické vlastnosti; iv) podporné údaje o známych účinkoch a v) známu potenciu v rozsahu želanej reakcie.

Prístup zdola nahor: prístup v postupných krokoch použitý v prípade testovanej chemikálie, o ktorej sa predpokladá, že si nevyžaduje klasifikáciu ako chemikália spôsobujúca podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí. Začína sa odlíšením chemikálií nevyžadujúcich klasifikáciu (negatívny výsledok) od ostatných chemikálií (pozitívny výsledok).

Chemikália: látka alebo zmes.

Podráždenie očí: vyvolanie zmien v oku po aplikácii testovanej chemikálie na predný povrch oka, ktoré sú do 21 dní po aplikácii úplne vratné. Pojem možno použiť zameniteľne s pojmom „vratné účinky na oči“ a kategóriou 2 podľa GHS OSN/CLP.

Miera falošnej negativity: podiel všetkých pozitívnych chemikálií, ktoré sú na základe testovacej metódy nesprávne identifikované ako negatívne. Je to jeden z ukazovateľov výkonnosti testovacej metódy.

Miera falošnej pozitivity: podiel všetkých negatívnych chemikálií, ktoré boli testovacou metódou nesprávne identifikované ako pozitívne. Je to jeden z ukazovateľov výkonnosti testovacej metódy.

Nebezpečnosť: inherentná vlastnosť činidla, prípadne situácia, ktorá môže vyvolať nepriaznivé účinky pri expozícii organizmu, systému alebo (sub)populácie účinkom daného činidla.

Kontrola s médiom: neošetrený replikát, ktorý obsahuje všetky zložky testovacieho systému. Táto vzorka sa spracuje so vzorkami ošetrenými testovanou chemikáliou, ako aj s inými kontrolnými vzorkami s cieľom zistiť, či rozpúšťadlo a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Zmes: zmes alebo roztok zložený z dvoch alebo viacerých látok.

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej 80 hm. %.

MTT: 2,5-difenyl-3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)tetrazólium-bromid, tiazolylová modrá tetrazólium-bromid.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii $\geq$ 10 hm. % a $<$ 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo k chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

▼M8

OD: optická hustota.

Pozitívna kontrola: replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému a ošetrený látkou, ktorá je známa tým, že vyvoláva pozitívnu reakciu. Aby bolo možné vyhodnotiť variabilitu reakcie na pozitívnu kontrolu v čase, rozsah pozitívnej reakcie by nemal byť nadmerný.

Relevantnosť: opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej sa testom správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testovacej metódy (10).

Spoľahlivosť: vyjadruje rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Hodnotí sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a vnútrolaboratórnej opakovateľnosti (13).

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (10).

Vážne poškodenie očí: poškodenie očného tkaniva alebo veľmi výrazné zhoršenie zraku, ku ktorému dôjde po aplikácii testovanej chemikálie na predný povrch oka, ktoré nie je úplne vratné do 21 dní po aplikácii. Pojem možno použiť zameniteľne s pojmom „nevratné účinky na oči“ a kategóriou 1 podľa GHS OSN/CLP.

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom: neošetrená vzorka, ktorá obsahuje všetky zložky testovacieho systému vrátane rozpúšťadla alebo nosiča a ktorá sa spracuje so vzorkami ošetrenými testovanou chemikáliou a s inými kontrolnými vzorkami, aby sa zistila základná reakcia vzoriek ošetrených testovanou chemikáliou rozpustenou v tom istom rozpúšťadle alebo nosiči. Keď sa táto vzorka testuje so súbežnou kontrolou s médiom, preukáže sa aj to, či rozpúšťadlo alebo nosič a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (13).

Látka: chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie ich stability a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ktorý však nezahŕňa žiadne rozpúšťadlá, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo zmeny jej zloženia.

Povrchovo aktívna látka: takisto nazývaná surfaktant, je látka, ako napríklad detergent, ktorá dokáže znížiť povrchové napätie kvapaliny a tak jej umožniť penenie alebo prenikanie do tuhých látok. Nazýva sa aj zvlhčujúce činidlo.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M8

Stratégia viacúrovňového testovania: stratégia postupného testovania, pri ktorej sa všetky existujúce informácie o testovanej chemikálii kontrolujú v určitom poradí analýzou váhy dôkazov na každej z úrovní, pričom sa pred prechodom na ďalšiu úroveň zisťuje, či je k dispozícii dostatok informácií na rozhodnutie o klasifikácii nebezpečnosti. Ak sa dráždivý potenciál testovanej chemikálie môže stanoviť na základe existujúcich informácií, nevyžaduje sa žiadne ďalšie testovanie. Ak dráždivý potenciál testovanej chemikálie nemožno stanoviť na základe existujúcich informácií, vykonáva sa testovanie metódou postupných krokov na zvieratách, až kým sa nedá urobiť jednoznačná klasifikácia.

Prístup zhora nadol: prístup v postupných krokoch použitý v prípade testovanej chemikálie, o ktorej sa predpokladá, že spôsobuje vážne poškodenie očí. Začína sa odlíšením chemikálií spôsobujúcich vážne poškodenie očí (pozitívny výsledok) od ostatných chemikálií (negatívny výsledok).

Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií OSN (GHS OSN): systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálnej, zdravotnej a environmentálnej nebezpečnosti a ich označovanie zodpovedajúcimi komunikačnými prvkami, ako sú piktogramy, výstražné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o nepriaznivých účinkoch daných chemikálií v záujme ochrany osôb (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a subjektov reakcie na núdzové situácie) a životného prostredia (1).

Kategória 1 podľa GHS OSN/CLP: pozri „vážne poškodenie očí“.

Kategória 2 podľa GHS OSN/CLP: pozri „podráždenie očí“.

„Bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP: chemikálie, ktoré nie sú klasifikované v kategórii 1 ani 2 podľa GHS OSN/CLP (prípadne v kategórii 2A ani 2B podľa GHS OSN).

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

▼M8

B.69. **TESTOVACIA METÓDA S VYUŽITÍM REKONŠTRUOVANÉHO EPITELU PODOBNÉHO ĽUDSKEJ ROHOVKE (RhCE) NA IDENTIFIKÁCIU CHEMIKÁLIÍ, KTORÉ SI NEVYŽADUJÚ KLASIFIKÁCIU A OZNAČOVANIE AKO CHEMIKÁLIE SPÔSOBUJÚCE PODRÁŽDENIE OČÍ ALEBO VÁŽNE POŠKODENIE OČÍ**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda (TM) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 492 (2017). *Vážne poškodenie očí* označuje poškodenie očného tkaniva alebo veľmi výrazné zhoršenie zraku, ku ktorému dôjde po aplikácii testovanej chemikálie na predný povrch oka, ktoré nie je úplne vratné do 21 dní po aplikácii, ako sa vymedzuje v Globálnom harmonizovanom systéme klasifikácie a označovania chemikálií Organizácie Spojených národov (GHS OSN) (1) a nariadení Európskej únie (EÚ) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (CLP) ([1]). Takisto podľa GHS OSN a CLP predstavuje *podráždenie očí* vyvolanie zmien v oku po aplikácii testovanej chemikálie na predný povrch oka, ktoré sú do 21 dní po aplikácii úplne vratné. Testované chemikálie, ktoré vyvolávajú vážne poškodenie očí, sú klasifikované v kategórii 1 podľa GHS OSN a CLP, zatiaľ čo chemikálie, ktoré vyvolávajú podráždenie očí, sú klasifikované v kategórii 2 GHS OSN a CLP. Testované chemikálie neklasifikované ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí sú vymedzené ako chemikálie, ktoré nespĺňajú požiadavky na klasifikáciu v kategórii 1 alebo 2 (2A alebo 2B) GHS OSN a CLP, t. j. uvádzajú sa ako chemikálie „bez kategórie“ podľa GHS OSN a CLP.

2. Posudzovanie vážneho poškodenia očí/podráždenia očí sa zvyčajne vykonávalo na laboratórnych zvieratách [TM B.5 (2)]. Výber najvhodnejšej testovacej metódy a jej použitie je potrebné posudzovať v kontexte usmerňovacieho dokumentu OECD o integrovaných prístupoch k testovaniu a hodnoteniu v prípade vážneho poškodenia očí a podráždenia očí (39).

3. V tejto testovacej metóde sa opisuje postup *in vitro*, ktorý umožňuje identifikáciu chemikálií (látok a zmesí), ktoré si nevyžadujú klasifikáciu a označovanie ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí v súlade s GHS OSN a CLP. Využíva sa pri nej rekonštruovaný epitel podobný ľudskej rohovke (RhCE), ktorý do veľkej miery napodobňuje histologické, morfologické, biochemické a fyziologické vlastnosti epitelu ľudskej rohovky. Validované sú štyri ďalšie testovacie metódy *in vitro*, ktoré sa považujú za vedecky platné a prijaté ako TM B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) a B.68 (6), pričom sa z hľadiska sledovaných parametrov ľudského zdravia týkajú vážneho poškodenia očí/podráždenia očí.

4. Súčasťou tejto testovacej metódy sú dva validované testy s využitím komerčne dostupných modelov RhCE. V súvislosti s podráždením očí/vážnym poškodením očí sa uskutočnili validačné štúdie (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) s využitím testu očnej dráždivosti (EIT) EpiOcular™ a testu očnej dráždivosti (EIT) s epitelom ľudskej rohovky SkinEthic™ (HCE). V každom z týchto testov sa ako testovací systém využívajú komerčne dostupné modely tkaniva RhCE, ktoré sa ďalej označujú ako validované referenčné metódy – VRM 1, resp. VRM2. Na základe týchto validačných štúdií a ich nezávislého partnerského preskúmania (9) (12) sa dospelo

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006, Ú. v. EÚ L 353/1, 31.12.2008.

▼M8

k záveru, že testy EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE EIT umožňujú správne identifikovanie chemikálií (látok aj zmesí), ktoré si nevyžadujú klasifikáciu a označovanie ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí podľa GHS OSN, a tieto testy sa odporúčajú ako vedecky platné na príslušný účel (13).

5. V súčasnosti sa vo všeobecnosti uznáva, že v dohľadnej budúcnosti nedokáže žiadna jednotlivá testovacia metóda *in vitro* úplne nahradiť Draizov očný test *in vivo* (2) (14) na účely predikcie úplného rozsahu reakcií, ktoré sa prejavujú vážnym poškodením očí/podráždením očí, pre rôzne triedy chemikálií. Draizov očný test (15) však možno dokážu nahradiť strategické kombinácie niekoľkých alternatívnych testovacích metód, napr. prístup zdola nahor/zhora nadol, v rámci (viacúrovňových) testovacích stratégií. Prístup zdola nahor (15) je určený na použitie v prípade, keď sa na základe existujúcich informácií očakáva, že chemikália nespôsobuje podráždenie očí v takej miere, aby sa pri nej vyžadovala príslušná klasifikácia, zatiaľ čo prístup zhora nadol (15) je určený na použitie v prípade, že sa na základe existujúcich informácií očakáva, že chemikália spôsobuje vážne poškodenie očí. Testy EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE EIT sa odporúčajú na identifikovanie chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí podľa GHS OSN/CLP („bez kategórie“), bez ďalšieho testovania, a to v rámci stratégie testovania, ako je napríklad prístup zdola nahor/zhora nadol, ktorý navrhol Scott a kol., napríklad ako prvý krok v prístupe zdola nahor alebo ako jeden z posledných krokov v prístupe zhora nadol (15). Testy EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE EIT nie sú zamýšľané na rozlišovanie medzi kategóriou 1 podľa GHS OSN/CLP (vážne poškodenie očí) a kategóriou 2 podľa GHS OSN/CLP (podráždenie očí). Toto rozlíšenie je potrebné zabezpečiť pomocou ďalšej úrovne stratégie testovania (15). V prípade testovanej chemikálie, pri ktorej sa pomocou testu EpiOcular™ EIT alebo SkinEthic™ HCE EIT určí, že si vyžaduje klasifikáciu ako chemikália spôsobujúca podráždenie očí/vážne poškodenie očí, sa bude vyžadovať doplňujúce testovanie (*in vitro* a/alebo *in vivo*), aby bolo možné dospieť k definitívnemu záveru („bez kategórie“, kategória 2 alebo kategória 1 podľa GHS OSN/CLP), a to napríklad pomocou TM B.47, B.48, B.61 alebo B.68.

6. Účelom tejto testovacej metódy je opísať postup používaný na hodnotenie potenciálu testovanej chemikálie predstavovať nebezpečnosť pre oči, a to na základe jej schopnosti vyvolať cytotoxicitu v modeli tkaniva RhCE podľa merania na základe skúšky MTT (16) (pozri odsek 21). Životaschopnosť tkaniva RhCE po expozícii testovanej chemikálii sa určuje na základe porovnania s tkanivami ošetrenými látkou negatívnej kontroly (percentuálna miera životaschopnosti) a následne slúži ako predpoklad potenciálu nebezpečnosti testovanej chemikálie pre oči.

7. K dispozícii sú výkonnostné normy (17) s cieľom uľahčiť validáciu nových alebo upravených testov *in vitro* na základe RhCE, ktoré sú podobné testom EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE EIT, a to v súlade so zásadami usmerňovacieho dokumentu OECD č. 34 (18), pričom umožňujú včasnú zmenu usmernenia OECD TG 492 na účely začlenenia týchto testov. Vzájomné uznávanie údajov (MAD) podľa dohody OECD bude možné garantovať len pri testoch validovaných podľa týchto výkonnostných noriem v prípade, že OECD tieto testy preskúmala a zaradila do príslušného usmernenia na vykonávanie testov.

VYMEDZENIE POJMOV

8. Vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 1.

▼**M8**

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

9. Táto testovacia metóda je založená na komerčných trojrozmerných modeloch tkaniva RhCE, ktoré sú vytvorené buď pomocou primárnych keratínocytov ľudskej epidermy (t. j. EpiOcular™ OCL-200), alebo ľudských imortalizovaných buniek epitelu rohovky (t. j. SkinEthic™ HCE/S). Modely tkaniva RhCE EpiOcular™ OCL-200 a SkinEthic™ HCE/S sú podobné trojrozmernej štruktúre epitelu rohovky *in vivo* a sú vytvorené pomocou buniek z druhov, ktoré sú predmetom záujmu (19) (20). Tieto testy okrem toho slúžia na priame meranie cytotoxicity v dôsledku preniknutia chemikálie cez rohovku a poškodenia buniek a tkaniva. Cytotoxická reakcia tak určuje celkový výsledok *in vivo* z hľadiska vážneho poškodenia očí/podráždenia očí. K poškodeniu buniek môže dôjsť viacerými spôsobmi účinku (pozri odsek 20), cytotoxicita však zohráva významnú, ak nie primárnu, mechanistickú úlohu pri určení celkovej reakcie spôsobenej chemikáliou z hľadiska vážneho poškodenia očí/podráždenia očí, ktorá sa prejavuje *in vivo* najmä zákalom rohovky, zápalom dúhovky, začervenaním spojoviek a/alebo chemózou spojoviek, a to bez ohľadu na fyzikálno-chemické procesy vedúce k poškodeniu tkaniva.

10. V rámci validačnej štúdie k tejto testovacej metóde sa testovalo široké spektrum chemikálií, ktoré zahŕňalo veľké množstvo chemických typov, chemických tried, molekulových hmotností, koeficientov LogP, chemických štruktúr atď. Validačná databáza testu EpiOcular™ EIT celkovo obsahuje 113 chemikálií, ktoré zahŕňajú 95 rozličných organických funkčných skupín podľa analýzy na základe množiny nástrojov OECD QSAR (8). Väčšinu z týchto chemikálií predstavovali jednozložkové látky, súčasťou štúdie však bolo aj viacero viaczložkových látok (vrátane 3 homopolymérov, 5 kopolymérov a 10 kvázipolymérov). Z hľadiska skupenstva a kategórií podľa GHS OSN/CLP bolo 113 testovaných chemikálií rozdelených takto: 13 kvapalín v kategórii 1, 15 tuhých látok v kategórii 1, 6 kvapalín v kategórii 2A, 10 tuhých látok v kategórii 2A, 7 kvapalín v kategórii 2B, 7 tuhých látok v kategórii 2B, 27 kvapalín „bez kategórie“ a 28 tuhých látok „bez kategórie“ (8). Validačná databáza testu SkinEthic™ HCE EIT celkovo obsahuje 200 chemikálií, ktoré zahŕňajú 165 rozličných organických funkčných skupín (8) (10) (11). Väčšinu z týchto chemikálií predstavovali jednozložkové látky, súčasťou štúdie však bolo aj viacero viaczložkových látok (vrátane 10 polymérov). Z hľadiska skupenstva a kategórií podľa GHS OSN/CLP bolo 200 testovaných chemikálií rozdelených takto: 27 kvapalín v kategórii 1, 24 tuhých látok v kategórii 1, 19 kvapalín v kategórii 2A, 10 tuhých látok v kategórii 2A, 9 kvapalín v kategórii 2B, 8 tuhých látok v kategórii 2B, 50 kvapalín „bez kategórie“ a 53 tuhých látok „bez kategórie“ (10) (11).

11. Táto testovacia metóda sa uplatňuje na látky a zmesi a na tuhé látky, kvapaliny, polotuhé látky a vosky. Kvapaliny môžu byť vodné alebo nevodné, tuhé látky môžu byť rozpustné alebo nerozpustné vo vode. Ak je to možné, tuhé látky sa pred aplikáciou rozomelú na jemný prášok; iná predpríprava vzorky nie je potrebná. Plyny a aerosóly ešte neboli posúdené vo validačnej štúdii. Aj keď je možné, že tieto látky sa môžu testovať technológiou RhCE, súčasná testovacia metóda neumožňuje testovanie plynov a aerosólov.

12. Testované chemikálie, ktoré absorbujú svetlo v rovnakom rozsahu ako formazán MTT (prirodzene alebo po ošetrení), a testované chemikálie, ktoré dokážu priamo redukovať vitálne farbivo MTT (na formazán MTT), môžu ovplyvňovať merania životaschopnosti tkaniva a na účely korekcie sa pri nich vyžaduje použitie prispôsobených kontrol. Typ prispôsobených kontrol, ktoré sa môžu vyžadovať, sa bude líšiť v závislosti od typu interferencie vyvolanej testovanou chemikáliou a postupu, ktorý slúži na kvantifikovanie formazánu MTT (pozri odseky 36 – 42).

▼**M8**

13. Na základe výsledkov získaných v predvalidačných (21) (22) a úplných validačných štúdiách (8) (10) (11) sa preukázalo, že testy EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE EIT sú prenosné do laboratórií, ktoré nemajú skúsenosti s vykonávaním takýchto skúšok, a považujú sa za reprodukovateľné v rámci laboratórií aj medzi laboratóriami. Na základe týchto štúdií je úroveň reprodukovateľnosti rádovo 95 % v rámci laboratórií a 93 % medzi laboratóriami z hľadiska zhody predpokladov, ktoré možno očakávať pri teste EpiOcular™ EIT na základe údajov o 113 chemikáliách. Úroveň reprodukovateľnosti je rádovo 92 % v rámci laboratórií a 95 % medzi laboratóriami z hľadiska zhody predpokladov, ktoré možno očakávať pri teste SkinEthic™ HCE EIT na základe údajov o 120 chemikáliách.

14. Test EpiOcular™ EIT možno použiť na identifikáciu chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí podľa klasifikačného systému GHS OSN a CLP. Vzhľadom na údaje získané v rámci validačnej štúdie (8) má test EpiOcular™ EIT celkovú presnosť 80 % (na základe 112 chemikálií), citlivosť 96 % (na základe 57 chemikálií), mieru falošnej negativity 4 % (na základe 57 chemikálií), špecifickosť 63 % (na základe 55 chemikálií) a mieru falošnej pozitivity 37 % (na základe 55 chemikálií) v porovnaní s údajmi referenčného očného testu *in vivo* na králikoch (TM B.5) (2) (14), ktoré sa klasifikovali podľa klasifikačného systému GHS OSN a CLP. V štúdii, v ktorej sa pomocou testu EpiOcular™ EIT testovalo 97 kvapalných agrochemických prípravkov, sa pri tomto type zmesí preukázala podobná výkonnosť tejto testovacej metódy, ako sa dosiahla vo validačnej štúdii (23). Týchto 97 prípravkov bolo rozdelených takto: 21 v kategórii 1, 19 v kategórii 2A, 14 v kategórii 2B a 43 „bez kategórie“ podľa klasifikácie v zmysle klasifikačného systému GHS OSN na základe údajov referenčného očného testu *in vivo* na králikoch (TM B.5) (2) (14). Dosiahla sa celková presnosť 82 % (na základe 97 prípravkov), citlivosť 91 % (na základe 54 prípravkov), miera falošnej negativity 9 % (na základe 54 prípravkov), špecifickosť 72 % (na základe 43 prípravkov) a miera falošnej pozitivity 28 % (na základe 43 prípravkov) (23).

15. Test SkinEthic™ HCE EIT možno použiť na identifikáciu chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí podľa klasifikačného systému GHS OSN a CLP. Vzhľadom na údaje získané v rámci validačnej štúdie (10) (11) má test SkinEthic™ HCE EIT celkovú presnosť 84 % (na základe 200 chemikálií), citlivosť 95 % (na základe 97 chemikálií), mieru falošnej negativity 5 % (na základe 97 chemikálií), špecifickosť 72 % (na základe 103 chemikálií) a mieru falošnej pozitivity 28 % (na základe 103 chemikálií) v porovnaní s údajmi referenčného očného testu *in vivo* na králikoch (TM B.5) (2) (14), ktoré sa klasifikovali podľa klasifikačného systému GHS OSN a CLP.

16. Miery falošnej negativity zistené pri oboch testoch RhCE v prípade látok alebo zmesí sa nachádzajú v rozmedzí 12 % celkovej pravdepodobnosti toho, že pri opakovaných testoch budú chemikálie zaradené do kategórie 2 podľa GHS OSN a CLP alebo budú označené ako chemikálie bez kategórie podľa GHS OSN a CLP na základe Draizovho očného testu *in vivo*, čo je dôsledkom vnútornej variability v rámci testov pri tejto metóde (24). V kontexte tejto testovacej metódy nie sú miery falošnej negativity zistené pri oboch testovacích metódach RhCE v prípade látok alebo zmesí kritické, keďže všetky testované chemikálie, ktoré vyvolávajú životaschopnosť tkaniva rovnakú alebo nižšiu ako stanovené hraničné hodnoty (pozri odsek 44), si budú vyžadovať ďalšie testovanie pomocou iných testovacích metód *in vitro* alebo, ako posledná možnosť, testovanie na králikoch v závislosti od

▼M8

regulatórnych požiadaviek, a to pomocou stratégie postupného testovania v rámci prístupu založeného na analýze váhy dôkazov. Tieto testovacie metódy možno použiť pri všetkých typoch chemikálií, pričom pri negatívnom výsledku sa chemikália nemá klasifikovať ako chemikália spôsobujúca podráždenie očí a vážne poškodenie očí (bez kategórie podľa GHS OSN a CLP). Pred použitím testov EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE EIT podľa iných klasifikačných schém než GHS OSN/CLP je potrebné sa obrátiť na príslušné regulačné orgány.

17. Obmedzením tejto testovacej metódy je to, že neumožňuje rozlišovanie medzi podráždením očí/vratnými účinkami na oči (kategória 2) a vážnym poškodením očí/nevratnými účinkami na oči (kategória 1), ako sa vymedzujú v zmysle GHS OSN a CLP, ani medzi látkami dráždivými pre oči (voliteľná kategória 2A) a látkami mierne dráždivými pre oči (voliteľná kategória 2B), ako sa vymedzujú v zmysle GHS OSN (1). Na tieto účely sa vyžaduje ďalšie testovanie pomocou iných testovacích metód *in vitro*.

18. Pojem „testovaná chemikália“ sa v tejto testovacej metóde používa na označenie toho, čo sa testuje ([1]), a netýka sa použiteľnosti testovacej metódy RhCE na testovanie látok a/alebo zmesí.

PRINCÍP TESTU

19. Testovaná chemikália sa lokálne aplikuje najmenej na dva trojrozmerné modely tkaniva RhCE a zmeria sa životaschopnosť tkaniva po expozícii a po uplynutí inkubačného času po ošetrení. Tkanivá RhCE sa rekonštruujú z primárnych keratínocytov ľudskej epidermy alebo ľudských imortalizovaných buniek epitelu rohovky, ktoré sa niekoľko dní kultivovali, aby vznikol viacradový dlaždicový epitel s vysokou mierou diferenciácie, ktorý je morfologicky podobný epitelu v ľudskej rohovke. Model tkaniva RhCE v teste EpiOcular™ obsahuje najmenej tri životaschopné vrstvy buniek a nekeratinizovaný povrch, pričom má štruktúru podobnú rohovke, ktorá je obdobná štruktúre *in vivo*. Model tkaniva RhCE v teste SkinEthic™ HCE obsahuje najmenej štyri životaschopné vrstvy buniek vrátane cylindrických bazálnych buniek, prechodných polyedrických buniek (tzv. wing cells) a povrchových dlaždicových buniek, ktoré sú podobné bunkám normálneho epitelu ľudskej rohovky (20) (26).

20. Vážne poškodenie očí/podráždenie očí vyvolané chemikáliou, ktoré sa prejavuje *in vivo* najmä zákalom rohovky, zápalom dúhovky, začervenaním spojoviek a/alebo chemózou spojoviek, je dôsledkom kaskády udalostí, ktoré sa začínajú prienikom chemikálie cez rohovku a/alebo spojovku a poškodením buniek. K poškodeniu buniek môže dôjsť viacerými spôsobmi účinku vrátane lýzy bunkovej membrány (napr. povrchovo aktívnymi látkami, organickými rozpúšťadlami), koagulácie makromolekúl (najmä bielkovín) (napr. povrchovo aktívnymi látkami, organickými rozpúšťadlami, alkáliami a kyselinami), zmydelnením lipidov (napr. alkáliami) a alkyláciou alebo inými kovalentnými interakciami s makromolekulami (napr. bielidlami, peroxidmi a alkylačnými činidlami) (15) (27) (28). Preukázalo sa však, že cytotoxicita zohráva významnú, ak nie primárnu, mechanistickú úlohu pri určení celkovej reakcie spôsobenej chemikáliou z hľadiska vážneho poškodenia očí/podráždenia očí, a to bez ohľadu na fyzikálno-chemické procesy vedúce k poškodeniu tkaniva (29) (30). Okrem toho sa potenciál chemikálie spôsobiť vážne poškodenie očí/podráždenie očí v zásade určuje na základe rozsahu počiatočného poranenia (31), ktoré koreluje s rozsahom bunkovej smrti (29) a s rozsahom následných reakcií a konečných následkov (32). Slabo dráždivé

([1]) V júni 2013 sa na spoločnom zasadnutí OECD dospelo k dohode, že tam, kde je to možné, sa bude v nových a aktualizovaných usmerneniach OECD na vykonávanie testov na opis toho, čo sa testuje, jednotnejšie uplatňovať pojem „testovaná chemikália“.

▼M8

látky tak vo všeobecnosti ovplyvňujú len povrchový epitel rohovky, mierne a stredne dráždivé látky v zásade poškodzujú epitel a povrchovú strómu a silne dráždivé látky poškodzujú epitel, hlbokú strómu a niekedy aj endotel rohovky (30) (33). Pri meraní životaschopnosti modelu tkaniva RhCE po lokálnej expozícii testovanej chemikálii s cieľom identifikovať chemikálie, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce vážne poškodenie očí/podráždenie očí (bez kategórie podľa GHS OSN/CLP), sa vychádza z predpokladu, že všetky chemikálie vyvolávajúce vážne poškodenie očí alebo podráždenie očí budú vyvolávať cytotoxicitu v epiteli rohovky a/alebo spojovke.

21. Životaschopnosť tkaniva v modeloch RhCE sa štandardne meria na základe enzymatickej premeny vitálneho farbiva MTT [2,5-difenyl-3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)tetrazólium-bromid, tiazolylová modrá tetrazólium-bromid, číslo CAS 298-93-1)] prostredníctvom životaschopných buniek tkaniva na modrú soľ formazánu MTT, ktorá sa kvantitatívne meria po extrakcii z tkanív (16). Ako chemikálie, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu a označovanie podľa GHS OSN/CLP (bez kategórie), sa označujú tie, ktoré nespôsobujú zníženie životaschopnosti tkaniva pod vymedzenú prahovú hodnotu (t. j. životaschopnosť tkaniva > 60 % v testoch EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE EITL ([1]) alebo > 50 % v teste SkinEthic™ HCE EITS ([2])) (pozri odsek 44).

PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

22. Je potrebné, aby laboratóriá pred začatím bežného používania testov RhCE na regulačné účely preukázali technickú spôsobilosť tak, že správne stanovia predpoklady pre pätnásť chemikálií na preukázanie spôsobilosti uvedených v tabuľke 1. Tieto chemikálie boli zvolené spomedzi chemikálií použitých v rámci validačných štúdií metód VRM (8) (10) (11). Vo výbere sa v maximálnej možnej miere nachádzajú chemikálie, ktoré: i) zahŕňajú rôzne skupenstvá; ii) pokrývajú celý rozsah reakcií *in vivo* z hľadiska vážneho poškodenia očí/podráždenia očí na základe výsledkov s vysokou kvalitou, ktoré sa dosiahli v referenčnom očnom teste *in vivo* na králikoch (TM B.5) (2) (14), a na základe klasifikačného systému GHS OSN (t. j. kategórie 1, 2A, 2B alebo bez kategórie) (1) a klasifikačného systému CLP (t. j. kategórie 1, 2 alebo bez kategórie); iii) pokrývajú rôzne faktory klasifikácie *in vivo* (24)(25); iv) reprezentujú chemické triedy použité vo validačnej štúdii (8) (10) (11); v) zabezpečujú vhodné a široké zastúpenie organických funkčných skupín (8) (10) (11); vi) majú dobre vymedzené chemické štruktúry (8) (10) (11); vii) sú farebné a/alebo priame redukčné činidlá MTT; viii) počas validácií vyvolávali reprodukovateľné výsledky v testovacích metódach RhCE; ix) počas validačných štúdií pri nich boli pomocou testovacích metód RhCE stanovené správne predpoklady; x) pokrývajú celý rozsah reakcií *in vitro* na základe údajov s vysokou kvalitou z testovacích metód RhCE (životaschopnosť 0 až 100 %); xi) sú komerčne dostupné a xii) nie sú spojené s neúmernými nákladmi na nadobudnutie a/alebo zneškodnenie. V situáciách, keď uvedená chemikália nie je k dispozícii alebo ju z oprávnených dôvodov nemožno použiť, sa môže použiť iná chemikália, ktorá spĺňa uvedené kritériá, napr. spomedzi chemikálií použitých pri validácii VRM. Takéto odchýlky je však potrebné zdôvodniť.

([1]) EITL: test EIT pre kvapaliny v prípade SkinEthic™ HCE.
([2]) EITS: test EIT pre tuhé látky v prípade SkinEthic™ HCE.

▼M8

Tabuľka 1

Zoznam chemikálií na preukázanie spôsobilosti

Chemický názov	Registračné číslo CAS	Organická funkčná skupina (1)	Skupenstvo	Životaschopnosť pri VRM1 (%) (2)	Životaschopnosť pri VRM2 (%) (3)	Predpoklad pri VRM	Redukčné činidlo MTT	Farebná interferencia
Kategória 1 *in vivo* (4)								
metyltioglykolát	2365-48-2	ester kyseliny karboxylovej; tioalkohol	kvapalné	10,9 ±6,4	5,5 ±7,4	predpoklad nie je možný	Áno (silné)	Nie
hydroxyetyl akrylát	818-61-1	akrylát; alkohol	kvapalné	7,5 ±4,7 (5)	1,6 ±1,0	predpoklad nie je možný	Nie	Nie
2,5-dimetyl-2,5-hexándiol	110-03-2	alkohol	tuhé	2,3 ±0,2	0,2 ±0,1	predpoklad nie je možný	Nie	Nie
šťaveľan sodný	62-76-0	kyselina oxokarboxylová	tuhé	29,0 ±1,2	5,3 ±4,1	predpoklad nie je možný	Nie	Nie
Kategória 2A in vivo (4)								
2,4,11,13-tetraazatetradekándiimidamid, N,N″-bis(4-chlórfenyl)-3,12-diimino-, di-D-glukonát (20 %, vodný) (6)	18472-51-0	aromatický heterocyklický halogenid; arylhalogenid; dihydroxylová skupina; guanidín	kvapalné	4,0 ±1,1	1,3 ±0,6	predpoklad nie je možný	Nie	Áno (slabá)
benzoan sodný	532-32-1	aryl; karboxylová kyselina	tuhé	3,5 ±2,6	0,6 ±0,1	predpoklad nie je možný	Nie	Nie
Kategória* 2B *in vivo (4)								
dietyltoluamid	134-62-3	benzamid	kvapalné	15,6 ±6,3	2,8 ±0,9	predpoklad nie je možný	Nie	Nie
2,2-dimetyl-3-metylénbicyklo[2.2.1]heptán	79-92-5	alkán, rozvetvený s terciárnym uhlíkom; alkén; bicykloheptán, premostené kruhové karbocyklické zlúčeniny; cykloalkán	tuhé	4,7 ±1,5	15,8 ±1,1	predpoklad nie je možný	Nie	Nie
„Bez kategórie“ *in vivo* (4)								
1-etyl-3-metylimidazólium etylsulfát	342573-75-5	alkoxy; amónna soľ; aryl; imidazol; sulfát	kvapalné	79,9 ±6,4	79,4 ±6,2	bez kategórie	Nie	Nie

▼M8

Chemický názov	Registračné číslo CAS	Organická funkčná skupina (1)	Skupenstvo	Životaschopnosť pri VRM1 (%) (2)	Životaschopnosť pri VRM2 (%) (3)	Predpoklad pri VRM	Redukčné činidlo MTT	Farebná interferencia
dikaprylyl éter	629-82-3	alkoxy; éter	kvapalné	97,8 ±4,3	95,2 ±3,0	bez kategórie	Nie	Nie
piperonylbutoxid	51-03-6	alkoxy; benzodioxol; benzyl; éter	kvapalné	104,2 ±4,2	96,5 ±3,5	bez kategórie	Nie	Nie
polyetylénglykol (PEG-40) s hydrogenovaným ricínovým olejom	61788-85-0	akylal; alkohol; alyl; éter	viskózne	77,6 ±5,4	89,1 ±2,9	bez kategórie	Nie	Nie
1-(4-chlórfenyl)-3-(3,4-dichlórfenyl) močovina	101-20-2	aromatický heterocyklický halogenid; arylhalogenid; deriváty močoviny	tuhé	106,7 ±5,3	101,9 ±6,6	bez kategórie	Nie	Nie
2,2′-metylénbis(6-(2H-benztriazol-2-yl)-4(1,1,3,3-tetrametylbutyl)fenol)	103597-45-1	alkán rozvetvený s kvartérnym uhlíkom; fúzovaná karbocyklická aromatická látka; fúzované nasýtené heterocyklické látky; prekurzorové chinoidné zlúčeniny; terc-butyl	tuhé	102,7 ±13,4	97,7 ±5,6	bez kategórie	Nie	Nie
tetrafluórborát draselný	14075-53-7	anorganická soľ	tuhé	88,6 ±3,3	92,9 ±5,1	bez kategórie	Nie	Nie

Skratky:

Registračné číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service); GHS OSN = Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemických látok Organizácie Spojených národov (1); VRM1 = validovaná referenčná metóda, EpiOcular™ EIT; VRM2 = validovaná referenčná metóda, SkinEthic™ HCE EIT; Farebná interferencia = farebná interferencia s meraním absorbancie štandardu [optickej hustoty (OD)] formazánu MTT.

(1) Organická funkčná skupina priradená podľa vnorenej analýzy množiny nástrojov OECD Toolbox 3.1 (8).

(2) Na základe výsledkov získaných pomocou testu EpiOcular™ EIT v rámci validačnej štúdie podráždenia očí (EIVS) uskutočnenej organizáciou EURL ECVAM/združením Cosmetics Europe (8).

(3) Na základe výsledkov získaných pomocou testu SkinEthic™ HCE EIT v rámci validačnej štúdie (10) (11).

(4) Na základe výsledkov z očného testu *in vivo* na králikoch (TM B.5/OECD TG 405) (2) (14) a podľa klasifikácie GHS OSN.

(5) Na základe výsledkov získaných v rámci štúdie organizácie CEFIC CONsortium zameranej na stratégiu testovania podráždenia očí *in vitro* (CON4EI).

(6) Klasifikácia v kategóriách 2A alebo 2B závisí od interpretácie kritéria GHS OSN na rozlišovanie medzi týmito dvoma kategóriami, t. j. 1 z 3, resp. 2 z 3 zvierat s účinkami na 7. deň ako podmienka na klasifikáciu v kategórii 2A. Do štúdie *in vivo* boli zahrnuté 3 zvieratá. Všetky sledované parametre s výnimkou zákalu rohovky v prípade jedného zvieraťa sa do 7. dňa alebo skôr vrátili na nulovú hodnotu. Toto jedno zviera, ktoré sa do 7. dňa v plnej miere nezotavilo, vykazovalo (na 7. deň) zákal rohovky s hodnotou 1, ktorý sa na 9. deň vrátil na pôvodnú hodnotu.

23. Ako súčasť postupu overovania spôsobilosti sa odporúča, aby používatelia overili bariérové vlastnosti tkanív po ich doručení, ako to stanovuje výrobca modelu tkaniva RhCE (pozri odseky 25, 27 a 30). To je dôležité najmä vtedy, ak sa tkanivá zasielajú na veľkú vzdialenosť alebo počas dlhého časového obdobia. Po úspešnom stanovení testu a nadobudnutí a preukázaní spôsobilosti na jeho použitie už takéto overovanie nebude bežne potrebné. Pri pravidelnom používaní testu sa však odporúča naďalej posudzovať bariérové vlastnosti v pravidelných intervaloch.

▼M8

POSTUP

24. Táto testovacia metóda v súčasnosti zahŕňa vedecky platné testy EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE EIT (9) (12) (13), ktoré sa označujú ako validovaná referenčná metóda (VRM1, resp. VRM2). K testovacím metódam RhCE sú k dispozícii štandardné operačné postupy, ktoré sa majú používať pri zavádzaní a využívaní týchto testovacích metód v laboratóriu (34) (35). V nasledujúcich odsekoch a v dodatku 2 sú opísané hlavné zložky a postupy testov RhCE.

ZLOŽKY TESTOVACEJ METÓDY RHCE

Všeobecné podmienky

25. Na rekonštruovanie trojrozmerného epitelového tkaniva podobného ľudskej rohovke je potrebné použiť zodpovedajúce bunky získané z ľudského organizmu, pričom toto tkanivo má byť zložené z postupne vrstvených, nie však zrohovatených buniek. Model tkaniva RhCE sa pripravuje v podobe vložených častí s pórovitou syntetickou membránou, cez ktorú môžu k bunkám prenikať živiny. V rekonštruovanom epiteli podobnom rohovke sa majú nachádzať viaceré vrstvy životaschopných nekeratinizovaných epitelových buniek. Epitelový povrch v modeli tkaniva RhCE má byť v priamom kontakte so vzduchom, aby bola možná priama lokálna expozícia testovaným chemikáliám podobným spôsobom, ako by došlo k expozícii epitelu rohovky *in vivo*. Model tkaniva RhCE má predstavovať funkčnú bariéru, ktorá je dostatočne robustná na to, aby odolávala rýchlemu prenikaniu cytotoxických referenčných látok, ako je napríklad Triton X-100 alebo dodecylsulfát sodný (SDS). Bariérovú funkciu treba preukázať a môže sa posudzovať buď stanovením expozičného času potrebného na zníženie životaschopnosti tkaniva o 50 % (ET_{50}) po aplikácii referenčnej látky s pevne určenou koncentráciou (napr. 100 µl látky Triton X-100 v koncentrácii 0,3 obj. %), alebo stanovením koncentrácie, pri ktorej referenčná látka znižuje životaschopnosť tkanív o 50 % (IC_{50}) po pevne stanovenom expozičnom čase (napr. 30-minútové ošetrenie pomocou 50 µl SDS) (pozri odsek 30). Izolačné vlastnosti modelu tkaniva RhCE by mali zabrániť prieniku testovanej chemikálie okolo okraja životaschopného tkaniva, čo by mohlo viesť k chybnému modelovaniu expozície rohovky. Bunky získané z ľudského organizmu, ktoré slúžia na vytvorenie modelu tkaniva RhCE, by nemali byť kontaminované baktériami, vírusmi, mykoplazmami ani hubami. Je potrebné, aby dodávateľ overil sterilitu modelu tkaniva, čím sa potvrdí, že nie je kontaminovaný hubami a baktériami.

Funkčné podmienky

Životaschopnosť

26. Na kvantifikovanie životaschopnosti tkaniva sa používa skúška MTT (16). Životaschopné bunky modelu tkaniva RhCE redukujú vitálne farbivo MTT na vyzrážaný modrý formazánový produkt MTT, ktorý sa potom extrahuje z tkaniva pomocou izopropanolu (alebo podobného rozpúšťadla). Extrahovaný formazán MTT možno kvantifikovať buď meraním absorbancie štandardu [optickej hustoty (OD)] alebo spektrofotometriou HPLC/UPLC (36). OD samotného extrakčného rozpúšťadla by mala byť dostatočne nízka, t. j. OD < 0,1. Používatelia modelu tkaniva RhCE by sa mali ubezpečiť, že každá šarža modelu tkaniva RhCE spĺňa kritériá stanovené pre negatívnu kontrolu. Rozsahy prijateľnosti hodnôt OD pri negatívnej kontrole pre VRM sú uvedené v tabuľke 2. Používatelia HPLC/UPLC spektrofotometrie by mali používať rozsahy OD negatívnej kontroly uvedené v tabuľke 2 ako kritérium prijateľnosti pre negatívnu kontrolu. V správe o teste by sa malo zdokumentovať, že tkanivá ošetrené látkou, ktorá predstavuje negatívnu kontrolu, sú v expozičnom čase testu stabilné v kultúre (zabezpečujú podobné výsledky merania životaschopnosti tkaniva). Podobne má

▼M8

postupovať výrobca tkaniva v rámci uvoľnenia šarže tkaniva na účely kontroly kvality, v takom prípade sa však môžu uplatňovať iné kritériá prijateľnosti ako kritériá uvedené v tabuľke 2. Rozsah prijateľnosti (horná a dolná hranica) pre hodnoty optickej hustoty pri negatívnej kontrole (v podmienkach testovacej metódy na účely kontroly kvality) stanovuje autor/dodávateľ modelu tkaniva RhCE.

Tabuľka 2

Rozsahy prijateľnosti hodnôt OD pri negatívnej kontrole (pre používateľov testu)

Test	Dolná hranica prijateľnosti	Horná hranica prijateľnosti
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (protokoly pre kvapaliny aj tuhé látky)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (protokoly pre kvapaliny aj tuhé látky)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Pri tejto hranici prijateľnosti sa zohľadňuje možnosť predĺženého času prepravy/skladovania (napr. > 4 dni), pri ktorom sa preukázalo, že nemá vplyv na výkonnosť testovacej metódy (37).

Bariérová funkcia

27. Model tkaniva RhCE má byť dostatočne hrubý a robustný, aby odolával rýchlemu prenikaniu cytotoxických referenčných látok, čo sa odhaduje napríklad na základe hodnôt ET_{50} (Triton X-100) alebo IC_{50} (SDS) (tabuľka 3). Autor/dodávateľ modelu tkaniva RhCE má pri dodaní tkanív koncovému používateľovi preukázať bariérovú funkciu každej použitej šarže modelu tkaniva RhCE (pozri odsek 30).

Morfológia

28. Na základe histologického vyšetrenia modelu tkaniva RhCE sa má preukázať štruktúra epitelu podobného ľudskej rohovke (vrátane najmenej troch vrstiev životaschopných epitelových buniek a nekeratinizovaného povrchu). V prípade metód VRM stanovil vhodnú morfológiu autor/dodávateľ, preto ju nemusí preukazovať používateľ testovacej metódy pre každú použitú šaržu tkaniva.

Reprodukovateľnosť

29. Výsledky pozitívnych kontrol a negatívnych kontrol testovacej metódy by mali preukázať reprodukovateľnosť v čase.

Kontrola kvality (QC)

30. Model tkaniva RhCE sa má použiť, len ak autor/dodávateľ preukáže, že každá šarža modelu tkaniva RhCE spĺňa stanovené kritériá na uvoľnenie do obehu, v rámci ktorých sú najvýznamnejšími kritériami životaschopnosť (odsek 26) a bariérová funkcia (odsek 27). Rozsah prijateľnosti (horná a dolná hranica) pre bariérové funkcie, ktorý sa meria na základe hodnôt ET_{50} alebo IC_{50} (pozri odseky 25 a 26), stanovuje autor/dodávateľ modelu tkaniva RhCE. Rozsah prijateľnosti ET_{50} a IC_{50}, ktorý používa autor/dodávateľ modelu tkaniva RhCE (použitých v metódach VRM) ako kritériá kontroly kvality na uvoľnenie šarže, sa uvádza v tabuľke 3. Údaje preukazujúce súlad so všetkými kritériami na uvoľnenie do obehu má autor/dodávateľ modelu tkaniva RhCE poskytnúť používateľom testovacej metódy, aby mohli túto informáciu zahrnúť do správy o teste. Len výsledky dosiahnuté prostredníctvom tkanív, ktoré vyhovujú všetkým týmto kritériám na uvoľnenie do obehu, možno akceptovať na stanovenie predpokladov pri chemikáliách, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu a označovanie ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí v súlade s GHS OSN/CLP.

▼M8

Tabuľka 3

Kritérium kontroly kvality na uvoľnenie šarže

Test	Dolná hranica prijateľnosti	Horná hranica prijateľnosti
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl látky Triton X-100 v koncentrácii 0,3 obj. %)	ET_{50} = 12,2 min.	ET_{50} = 37,5 min.
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (30-minútové ošetrenie s 50 µl SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Aplikácia testovanej chemikálie a kontrolných látok

31. V každom testovacom cykle sa pri každej testovanej chemikálii a každej kontrolnej látke majú použiť aspoň dva replikáty tkaniva. Používajú sa dva rôzne protokoly ošetrenia, jeden pre kvapalné testované chemikálie a druhý pre tuhé testované chemikálie (34) (35). Pri oboch metódach a protokoloch sa pred aplikáciou testovanej chemikálie povrch modelu tkaniva zvlhčí pomocou Dulbeccovho fosfátového tlmivého fyziologického roztoku bez obsahu vápnika a horčíka (ďalej len DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}) s cieľom napodobniť vlhkosť prítomnú v ľudskom oku. Ošetrenie tkanív sa začína expozíciou testovanej chemikálii (testovaným chemikáliám) a kontrolným látkam. Pri oboch protokoloch ošetrenia v oboch VRM je potrebné na celý povrch epitelu rovnomerne naniesť dostatočné množstvo testovanej chemikálie alebo kontrolnej látky, pričom je nutné sa vyhýbať aplikovaniu nekonečnej dávky (pozri odseky 32 a 33) (dodatok 2).

32. V rámci VRM sa s testovanými chemikáliami, ktoré možno pipetovať pri teplote 37 °C alebo nižšej (v prípade potreby pomocou výtlakovej piestovej pipety), narába ako s kvapalinami, v opačnom prípade sa s nimi narába ako s tuhými látkami (pozri odsek 33). V rámci VRM sa kvapalné testované chemikálie rovnomerne rozotrú na povrch tkaniva (t. j. aplikácia minimálne 60 µl/cm^2) [pozri dodatok 2, (33) (34)]. S cieľom zaručiť správne dávkovanie na tkanivo je potrebné v čo najväčšej miere predísť kapilárnym účinkom (účinkom v dôsledku povrchového napätia), ktoré sa môžu vyskytnúť v súvislosti s nízkymi objemami aplikovanými na vloženú časť. Tkanivá ošetrené kvapalnými testovanými chemikáliami sa 30 minút inkubujú pri štandardných kultivačných podmienkach (37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %). Na konci expozičného času sa kvapalná testovaná chemikália a kontrolné látky opatrne odstránia z povrchu tkaniva dôkladným opláchnutím pomocou DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+} pri izbovej teplote. Po tomto opláchnutí nasleduje postexpozičné ponorenie do čerstvého média pri izbovej teplote (s cieľom odstrániť všetku testovanú chemikáliu absorbovanú do tkaniva) na vopred určený čas, ktorý sa líši v závislosti od použitej VRM. Postexpozičná inkubácia v čerstvom médiu pri štandardných kultivačných podmienkach sa pred uskutočnením skúšky MTT používa len v prípade VMR1 [pozri dodatok 2, (34) (35)].

33. S testovanými chemikáliami, ktoré nemožno pipetovať pri teplote do 37 °C, sa v rámci VRM narába ako s tuhými látkami. Aplikované množstvo testovanej chemikálie má byť dostatočné na to, aby sa pokryl celý povrch tkaniva, t. j. má sa aplikovať minimálne 60 mg/cm^2 (dodatok 2). Ak je to možné, tuhé látky by sa mali vždy testovať vo forme jemného prášku. Tkanivá ošetrené pomocou tuhých testovaných chemikálií sa inkubujú pri štandardných kultivačných podmienkach počas vopred určeného času (v závislosti od použitej VRM) [pozri dodatok 2, (34) (35)]. Na konci

▼M8

expozičného času sa tuhá testovaná chemikália a kontrolné látky opatrne odstránia z povrchu tkaniva dôkladným opláchnutím pomocou DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+} pri izbovej teplote. Po tomto opláchnutí nasleduje postexpozičné ponorenie do čerstvého média pri izbovej teplote (s cieľom odstrániť všetku testovanú chemikáliu absorbovanú do tkaniva) na vopred určený čas, ktorý sa líši v závislosti od použitej VRM, a postexpozičná inkubácia v čerstvom médiu pri štandardných kultivačných podmienkach pred uskutočnením skúšky MTT [pozri dodatok 2, (34) (35)].

34. Súčasťou každého testovacieho cyklu majú byť súbežné negatívne a pozitívne kontroly, aby sa preukázalo, že životaschopnosť (určená na základe negatívnej kontroly) a citlivosť (určená na základe pozitívnej kontroly) tkanív sú v rámci rozsahov prijateľnosti určených na základe historických údajov. Na základe súbežnej negatívnej kontroly sa získava aj základná hodnota (100 % životaschopnosť tkaniva) na výpočet relatívnej percentuálnej hodnoty životaschopnosti tkanív ošetrených testovanou chemikáliou (hodnota $\%Viability_{test}$). Látka pozitívnej kontroly odporúčaná na použitie s týmito VRM je čistý metylacetát (č. CAS 79-20-9, komerčne dostupný napr. od spoločnosti Sigma-Aldrich, kat. č. 45997; kvapalina). Odporúčanými látkami negatívnej kontroly sú v prípade VRM1 ultračistá H_2O a v prípade VRM2 DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}. Tieto kontrolné látky sa použili pri validačných štúdiách týchto VRM a existuje pre ne najviac historických údajov. Použitie vhodných alternatívnych látok pozitívnej a negatívnej kontroly je potrebné vedecky a zodpovedajúcim spôsobom odôvodniť. Negatívne a pozitívne kontroly sa majú testovať pomocou rovnakých protokolov, aké sa použili pri testovaných chemikáliách v rámci príslušného testovacieho cyklu (t. j. pre kvapaliny a/alebo tuhé látky). Po aplikácii má podľa potreby nasledovať expozícia s ošetrením, opláchnutie, postexpozičné ponorenie a postexpozičná inkubácia podľa opisu pre kontroly vykonávané súbežne s kvapalnými testovanými chemikáliami (pozri odsek 32) alebo pre kontroly vykonávané súbežne s tuhými testovanými chemikáliami (pozri odsek 33) pred uskutočnením skúšky MTT (pozri odsek 35) (34) (35). Pre všetky testované chemikálie s rovnakým skupenstvom (kvapaliny alebo tuhé látky), ktoré sú súčasťou rovnakého testovacieho cyklu, postačuje jedna samostatná množina negatívnych a pozitívnych kontrol.

Meranie životaschopnosti tkaniva

35. Skúška MTT je štandardizovaná kvantitatívna metóda (16), ktorá sa má používať na meranie životaschopnosti tkaniva v rámci tejto testovacej metódy. Je vhodná na použitie v trojrozmernom modeli tkaniva. Skúška MTT sa vykonáva bezprostredne po uplynutí postexpozičného inkubačného času. V rámci VRM sa vzorka modelu tkaniva umiestni do 0,3 ml roztoku MTT v koncentrácii 1 mg/ml na 180 ±15 minút pri štandardných kultivačných podmienkach. Životaschopné bunky modelu tkaniva RhCE redukujú vitálne farbivo MTT na vyzrážaný modrý formazánový produkt MTT. Vyzrážaný modrý formazánový produkt MTT sa potom extrahuje z tkaniva pomocou vhodného objemu izopropanolu (alebo podobného rozpúšťadla) (34) (35). Pri tkanivách testovaných s kvapalnými testovanými chemikáliami sa extrakcia uskutočňuje z vrchnej aj zo spodnej strany tkaniva, zatiaľ čo pri tkanivách testovaných s tuhými testovanými chemikáliami a farebnými kvapalinami sa extrakcia uskutočňuje len zo spodnej strany tkaniva (aby sa minimalizovala potenciálna kontaminácia extrakčného roztoku izopropanolu akoukoľvek testovanou chemikáliou, ktorá by mohla zostať v tkanive). Pri tkanivách testovaných s kvapalnými testovanými chemikáliami, ktoré nemožno jednoducho zmyť, sa extrakcia môže takisto uskutočňovať len zo spodnej strany tkaniva. So súbežne testovanými látkami negatívnej a pozitívnej kontroly sa zaobchádza podobne ako s testovanými chemikáliami. Extrahovaný formazán MTT možno kvantifikovať buď meraním absorbancie štandardu (OD) pri vlnovej dĺžke 570 nm pomocou filtra pásma priepustnosti s maximálnou odchýlkou ±30 nm alebo spektrofotometriou HPLC/UPLC (pozri odsek 42) (11) (36).

▼M8

36. Optické vlastnosti testovanej chemikálie alebo jej chemický účinok na MTT môžu interferovať s meraním formazánu MTT, čo vedie k nesprávnemu odhadu životaschopnosti tkaniva. Testované chemikálie môžu interferovať s meraním formazánu MTT priamou redukciou MTT na modrý formazán MTT a/alebo farebnou interferenciou, ak pri testovaných chemikáliách prirodzene alebo v dôsledku postupov ošetrenia dochádza k absorpcii v rovnakom rozsahu OD ako pri formazáne MTT (t. j. približne 570 nm). Pred testovaním sa má uskutočniť predbežné overenie, aby bolo možné identifikovať možné priame redukčné činidlá MTT a/alebo chemikálie spôsobujúce farebnú interferenciu, pričom je potrebné použiť dodatočné kontroly s cieľom rozpoznať potenciálne interferencie spôsobené takýmito testovanými chemikáliami a skúšku vzhľadom na tieto interferencie korigovať (pozri odseky 37 – 41). Obzvlášť dôležité je to vtedy, keď sa špecifická testovaná chemikália opláchnutím úplne neodstráni z modelu tkaniva RhCE alebo keď prenikne do epitelu podobného rohovke a je tak prítomná v modeloch tkaniva RhCE počas vykonávania skúšky MTT. V prípade testovaných chemikálií, ktoré absorbujú svetlo v rovnakom rozsahu ako formazán MTT (prirodzene alebo po ošetrení) a pri ktorých nemožno použiť meranie absorbancie štandardu (OD) formazánu MTT v dôsledku príliš silnej interferencie, t. j. silnej absorpcie v rozsahu 570 ±30 nm, možno na meranie formazánu MTT použiť spektrofotometriu HPLC/UPLC (pozri odseky 41 a 42) (11) (36). V štandardných pracovných postupoch VRM (34) (35) sa nachádza podrobný opis detekcie priamej redukcie MTT a interferencií spôsobených farbivami, ako aj následnej korekcie skúšky. Ilustratívne vývojové diagramy poskytujúce usmernenie o tom, ako možno identifikovať a zohľadniť priame redukčné činidlá MTT a/alebo chemikálie spôsobujúce farebnú interferenciu pri VRM1 a VRM2, sa uvádzajú aj v dodatku III, resp. IV.

37. S cieľom identifikovať potenciálnu interferenciu spôsobenú testovanými chemikáliami, ktoré absorbujú svetlo v rovnakom rozsahu ako formazán MTT (prirodzene alebo po ošetrení), a prijať rozhodnutie o tom, či sú potrebné dodatočné kontroly, sa testovaná chemikália pridá do vody a/alebo izopropanolu a primeraný čas sa inkubuje pri izbovej teplote [pozri dodatok 2, (34) (35)]. Ak testovaná chemikália vo vode a/alebo izopropanole absorbuje dostatok svetla v rozsahu 570 ±20 nm v prípade VRM1 (pozri dodatok 3) alebo ak vznikne zafarbený roztok pri zmiešaní testovanej chemikálie s vodou v prípade VRM2 (pozri dodatok 4), predpokladá sa, že dochádza k interferencii testovanej chemikálie s meraním absorbancie štandardu (OD) formazánu MTT, a je potrebné uskutočniť ďalšie kontroly s farbivami alebo sa má prípadne použiť spektrofotometria HPLC/UPLC v prípade, že sa tieto kontroly nevyžadujú (pozri odseky 41 a 42 a dodatky III a IV) (34) (35). Pri meraní absorbancie štandardu (OD) sa každá testovaná chemikália spôsobujúca interferenciu aplikuje najmenej na dva životaschopné replikáty tkaniva, pri ktorých sa uskutoční celý postup testovania, ale počas kroku MTT inkubácie sa namiesto roztokom MTT inkubujú s médiom, aby sa získala kontrola s nešpecifickou farbou v živých tkanivách (kontrola NSC_{living}) (34) (35). Kontrolu NSC_{living} je potrebné uskutočniť súbežne s testovaním farebnej testovanej chemikálie a v prípade viacnásobného testovania je potrebné uskutočniť nezávislú kontrolu NSC_{living} pri každom uskutočnenom teste (v každom testovacom cykle) vzhľadom na inherentnú biologickú variabilitu živých tkanív. Skutočná životaschopnosť tkaniva sa vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaný zo živých tkanív vystavených testovanej chemikálii spôsobujúcej interferenciu a inkubovaných s roztokom MTT (tzn. hodnota $\%Viability_{test}$) mínus percentuálny podiel pri kontrole s nešpecifickou farbou získaný zo živých tkanív vystavených testovanej chemikálii spôsobujúcej interferenciu a inkubovaných v médiu bez MTT, pričom táto kontrola sa uskutoční súbežne s korigovaným testom (tzn. hodnota % NSC_{living}), t. j. skutočná životaschopnosť tkaniva = $[\%Viability_{test}] - [\%NSC_{living}]$.

38. S cieľom identifikovať priame redukčné činidlá MTT sa každá testovaná chemikália pridá do čerstvo pripraveného roztoku MTT. K roztoku MTT sa pridá primerané množstvo testovanej chemikálie a zmes sa približne 3

▼M8

hodiny inkubuje v štandardných kultivačných podmienkach (pozri dodatky III a IV) (34) (35). Ak sa zmes MTT obsahujúca testovanú chemikáliu (alebo suspenzia v prípade nerozpustných testovaných chemikálií) sfarbí na modro/fialovo, predpokladá sa, že testovaná chemikália priamo redukuje MTT, a je potrebné uskutočniť ďalšiu funkčnú kontrolu na neživotaschopných modeloch tkaniva RhCE, a to nezávisle od použitia merania absorbancie štandardu (OD) alebo spektrofotometrie HPLC/UPLC. Pri tejto dodatočnej funkčnej kontrole sa využívajú usmrtené tkanivá, ktoré majú len zvyškovú metabolickú aktivitu, ale absorbujú a zadržiavajú testovanú chemikáliu podobne ako životaschopné tkanivá. Usmrtené tkanivá sa v prípade VRM1 pripravujú vystavením nízkej teplote („usmrtené zmrazením“). Usmrtené tkanivá sa v prípade VRM2 pripravujú predĺženou inkubáciou (napr. aspoň 24 ±1 h) vo vode a následným uložením pri nízkej teplote („usmrtené vodou“). Každá testovaná chemikália redukujúca MTT sa aplikuje najmenej na dva replikáty usmrteného tkaniva, pri ktorých sa uskutoční celý postup testovania, aby sa získala kontrola s nešpecifickou redukciou MTT (kontrola NSMTT) (34) (35) Bez ohľadu na počet uskutočnených nezávislých testov/testovacích cyklov je dostatočná jedna kontrola NSMTT na testovanú chemikáliu. Skutočná životaschopnosť tkaniva sa vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaný zo živých tkanív vystavených chemikálii redukujúcej MTT (tzn. hodnota $\%Viability_{test}$) mínus percentuálny podiel nešpecifickej redukcie MTT získaný z usmrtených tkanív vystavených tej istej chemikálii redukujúcej MTT, počítané vzhľadom na negatívnu kontrolu uskutočnenú súbežne s korigovaným testom (tzn. hodnota %NSMTT), t. j. skutočná životaschopnosť tkaniva = $[\%Viability_{test}] - [\%NSMTT]$.

39. V prípade testovaných chemikálií, pri ktorých sa zistilo, že vyvolávajú farebnú interferenciu (pozri odsek 37) aj priamu redukciu MTT (pozri odsek 38), sa bude pri vykonávaní merania absorbancie štandardu (OD) vyžadovať aj tretia množina kontrol popri kontrolách NSMTT a NSC_{living} opísaných v predchádzajúcich odsekoch. Platí to zvyčajne pri tmavo sfarbených testovaných chemikáliách, ktoré absorbujú svetlo v rozsahu 570 ±30 nm (napr. modré, fialové, čierne), pretože ich vlastná farba bráni posúdeniu ich schopnosti priamo redukovať MTT podľa opisu v odseku 38. Z toho dôvodu sa štandardne vyžaduje použitie kontrol NSMTT spolu s kontrolami NSC_{living}. Testované chemikálie, pre ktoré sa uskutočňujú kontroly NSMTT aj NSC_{living}, môžu byť absorbované a zadržiavané v živých aj usmrtených tkanivách. V tomto prípade preto kontrola NSMTT môže nielen umožniť korekciu vzhľadom na potenciálnu priamu redukciu MTT testovanou chemikáliou, ale aj vzhľadom na farebnú interferenciu, ku ktorej dochádza v dôsledku absorpcie a zadržiavania testovanej chemikálie v usmrtených tkanivách. Mohlo by to viesť k dvojitej korekcii vzhľadom na farebnú interferenciu, keďže pomocou kontrol NSC_{living} sa už umožňuje zohľadňovať farebnú interferenciu, ku ktorej dochádza v dôsledku absorpcie a zadržiavania testovanej chemikálie v usmrtených tkanivách. S cieľom predísť možnej dvojitej korekcii vzhľadom na farebnú interferenciu je potrebné uskutočniť tretiu kontrolu s nešpecifickou farbou v usmrtených tkanivách (NSC_{killed}) (pozri dodatky III a IV) (34) (35). Pri tejto dodatočnej kontrole sa testovaná chemikália aplikuje najmenej na dva replikáty usmrteného tkaniva, pri ktorých sa uskutoční celý postup testovania, ale ktoré sa počas kroku MTT inkubácie namiesto roztokom MTT inkubujú s médiom. Bez ohľadu na počet uskutočnených nezávislých testov/testovacích cyklov je dostatočná jedna kontrola NSC_{killed} na testovanú chemikáliu, má sa však uskutočniť súbežne s kontrolou NSMTT a s rovnakou šaržou tkaniva. Skutočná životaschopnosť tkaniva sa vypočíta ako percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva získaný zo živých tkanív vystavených testovanej chemikálii (tzn. hodnota $\%Viability_{test}$) mínus hodnota %NSMTT mínus hodnota $\%NSC_{living}$ plus percentuálny podiel kontroly s nešpecifickou farbou získaný z usmrtených tkanív vystavených testovanej chemikálii spôsobujúcej interferenciu a inkubovaných v médiu bez MTT, počítané vzhľadom na negatívnu kontrolu uskutočnenú súbežne s korigovaným testom (tzn. hodnota $\%NSC_{killed}$), t. j. skutočná životaschopnosť tkaniva = $[\%Viability_{test}] - [\%NSMTT] - [\%NSC_{living}] + [\%NSC_{killed}]$.

▼M8

40. Je dôležité poznamenať, že nešpecifická redukcia MTT a nešpecifické farebné interferencie môžu zvýšiť OD (pri meraniach absorbancie štandardu) extraktu tkaniva nad rozsah linearity spektrofotometra a že nešpecifická redukcia MTT takisto môže pri extrakte tkaniva zvýšiť plochu píku formazánu MTT (pri meraniach pomocou spektrofotometrie HPLC/UPLC) nad rozsah linearity spektrofotometra. Vzhľadom na to je dôležité, aby každé laboratórium pred začatím testovania testovaných chemikálií na regulačné účely určilo rozsah linearity OD/plochy píku svojho spektrofotometra, napríklad s použitím formazánu MTT (č. CAS 57360-69-7), ktorý je komerčne dostupný napríklad od spoločnosti Sigma-Aldrich (kat. č. M2003).

41. Meranie absorbancie štandardu (OD) pomocou spektrofotometra je vhodné na posúdenie chemikálií priamo redukujúcich MTT a testovaných chemikálií spôsobujúcich farebnú interferenciu v prípade, že pozorovaná interferencia s meraním formazánu MTT nie je príliš silná (t. j. hodnoty OD extraktov tkanív získané pri použití testovanej chemikálie bez akejkoľvek korekcie vzhľadom na priamu redukciu MTT a/alebo farebnú interferenciu sa nachádzajú v lineárnom rozsahu spektrofotometra). V prípade testovaných chemikálií, ktoré vykazujú hodnoty %NSMTT a/alebo $\%NSC_{living} \geq 60$ % (VRM1 a v prípade protokolu pre kvapaliny aj VRM2) alebo 50 % (VRM2 v prípade protokolu pre tuhé látky) negatívnej kontroly, je potrebné k výsledkom pristupovať obozretne, keďže je to stanovená hraničná hodnota, ktorá sa v rámci VRM používa na rozlišovanie medzi klasifikovanými a neklasifikovanými chemikáliami (pozri odsek 44). Meranie absorbancie štandardu (OD) však nie je možné v prípade príliš silnej interferencie s meraním formazánu MTT (t. j. takej, ktorá vedie k tomu, že nekorigované hodnoty OD extraktov testovaných tkanív sa nachádzajú mimo lineárneho rozsahu spektrofotometra). Farebné testované chemikálie alebo testované chemikálie, ktoré sa sfarbia pri kontakte s vodou alebo izopropanolom, pri ktorých dochádza k príliš silnej interferencii s meraním absorbancie štandardu (OD) formazánu MTT, je možné napriek tomu posúdiť pomocou spektrofotometrie HPLC/UPLC (pozri dodatky III a IV). Dôvodom je, že systém HPLC/UPLC umožňuje separáciu formazánu MTT od chemikálie pred jej kvantifikáciou (36). Preto sa pri použití HPLC/UPLC spektrofotometrie nikdy nevyžadujú kontroly NSC_{living} ani NSC_{killed}, a to bez ohľadu na testovanú chemikáliu. Kontroly NSMTT sa však majú použiť, ak existuje podozrenie, že testovaná chemikália priamo redukuje MTT (podľa postupu opísaného v odseku 38). Kontroly NSMTT sa majú použiť aj v prípade testovaných chemikálií, ktoré majú farbu (vlastnú alebo objavujúcu sa pri kontakte s vodou), ktorá bráni posúdeniu ich schopnosti priamo redukovať MTT podľa opisu v odseku 38. Pri použití HPLC/UPLC spektrofotometrie na meranie formazánu MTT sa percentuálny podiel životaschopnosti tkaniva vypočíta ako percentuálny podiel plochy píku formazánu MTT, ktorý sa získa zo živých tkanív vystavených testovanej chemikálii, v porovnaní s píkom formazánu MTT získaným zo súbežnej negatívnej kontroly. V prípade testovaných chemikálií, ktoré sú schopné priamo redukovať MTT, sa skutočná životaschopnosť tkaniva vypočíta takto: hodnota $\%Viability_{test}$ mínus hodnota %NSMTT podľa opisu v poslednej vete odseku 38. Na záver je potrebné poznamenať, že pomocou testovacích metód RhCE nemožno posudzovať priame redukčné činidlá MTT ani priame redukčné činidlá MTT spôsobujúce zároveň farebnú interferenciu, ktoré sú po ošetrení zadržiavané v tkanivách a redukujú MTT natoľko výrazne, že sa hodnoty OD (pomocou štandardného merania OD) alebo plochy píku (pomocou UPLC/HPLC spektrofotometrie) testovaných extraktov tkaniva nachádzajú v dôsledku toho mimo rozsahu linearity spektrofotometra. Očakáva sa však, že k tomu dôjde len vo veľmi zriedkavých situáciách.

42. Na meranie formazánu MTT možno HPLC/UPLC spektrofotometriu použiť pri všetkých typoch testovaných chemikálií (zafarbené, nezafarbené, pôsobiace aj nepôsobiace ako reduktanty MTT) (11) (36). Vzhľadom na rôznorodosť systémov HPLC/UPLC spektrofotometrie nie je možné, aby každý používateľ vytvoril presne rovnaké systémové podmienky.

▼M8

Je preto potrebné preukázať kvalifikáciu systému HPLC/UPLC spektrofotometrie pred jeho použitím na kvantifikovanie formazánu MTT z extraktov tkaniva, a to splnením kritérií prijateľnosti pre množinu štandardných kvalifikačných parametrov na základe parametrov opísaných v usmernení Amerického úradu pre potraviny a lieky o validácii bioanalytických metód pre príslušné odvetvie (36) (38). Tieto kľúčové parametre a kritériá prijateľnosti sú uvedené v dodatku 5. Po splnení kritérií prijateľnosti uvedených v dodatku 5 sa systém HPLC/UPLC spektrofotometrie považuje za vyhovujúci a pripravený na meranie formazánu MTT za pokusných podmienok opísaných v tejto testovacej metóde.

Kritériá prijateľnosti

43. Pri každom testovacom cykle s využitím šarží tkaniva RhCE, ktoré vyhovujú kontrole kvality (pozri odsek 30), by tkanivá ošetrené látkou negatívnej kontroly mali vykazovať optickú hustotu (OD), ktorá odráža kvalitu tkanív po krokoch zaslania a prijatia a po všetkých procesoch protokolu a ktorá by nemala byť mimo historicky stanovených hraníc opísaných v tabuľke 2 (pozri odsek 26). Podobne by tkanivá ošetrené látkou pozitívnej kontroly, napr. metylacetátom, mali vykazovať strednú životaschopnosť tkaniva < 50 % vzhľadom na negatívnu kontrolu v rámci VRM1 pri protokole pre kvapaliny alebo tuhé látky a ≤ 30 % (protokol pre kvapaliny) alebo ≤ 20 % (protokol pre tuhé látky) vzhľadom na negatívnu kontrolu v rámci VRM2, čo vyjadruje schopnosť tkanív reagovať na dráždivú testovanú chemikáliu v podmienkach tejto testovacej metódy (34) (35). Variabilita medzi tkanivovými replikátmi testovaných chemikálií a kontrolných látok by mala byť v rámci uznaných limitov [t. j. rozdiel v životaschopnosti medzi dvoma replikátmi tkaniva má byť menej ako 20 % alebo štandardná odchýlka (SD) medzi tromi replikátmi tkaniva nemá prekročiť 18 %]. Ak je negatívna kontrola alebo pozitívna kontrola v rámci testovacieho cyklu mimo uznaných rozsahov, pokus sa považuje za nevyhovujúci a je potrebné ho zopakovať. Ak je variabilita medzi tkanivovými replikátmi testovanej chemikálie mimo uznaného rozsahu, test sa musí považovať za nevyhovujúci a testovanú chemikáliu je potrebné testovať znova.

Interpretácia výsledkov a prognostický model

44. Hodnoty OD/plochy píku získané pomocou replikovaných extraktov tkaniva pre každú testovanú chemikáliu sa použijú na výpočet strednej percentuálnej hodnoty životaschopnosti tkaniva (stredná hodnota medzi replikátmi tkaniva) normalizovanej podľa negatívnej kontroly, ktorá je stanovená na 100 %. Hraničné percentuálne hodnoty životaschopnosti tkaniva na identifikáciu testovaných chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí („bez kategórie“ podľa GHS OSN a CLP), sa uvádzajú v tabuľke 4. Výsledky sa interpretujú takto:

— Testovaná chemikália sa považuje za chemikáliu, ktorá si nevyžaduje klasifikáciu a označovanie podľa GHS OSN a CLP („bez kategórie“), ak stredná percentuálna hodnota životaschopnosti tkaniva po expozícii a postexpozičnej inkubácii je vyššia ako (>) stanovená hraničná percentuálna hodnota životaschopnosti tkaniva, ako sa uvádza v tabuľke 4. V tomto prípade sa nevyžaduje ďalšie testovanie pomocou iných testovacích metód.

▼M8

— Ak stredná percentuálna hodnota životaschopnosti tkaniva po expozícii a postexpozičnej inkubácii je nižšia alebo rovnaká ako (≤) stanovená hraničná percentuálna hodnota životaschopnosti tkaniva, predpoklad nie je možný, ako sa uvádza v tabuľke 4. V tomto prípade sa vyžaduje ďalšie testovanie pomocou iných testovacích metód, pretože testovacie metódy RhCE vykazujú určitý počet falošne pozitívnych výsledkov (pozri odseky 14 – 15) a neumožňujú rozlišovať medzi kategóriou 1 a 2 podľa GHS OSN a CLP (pozri odsek 17).

Tabuľka 4

Prognostické modely podľa klasifikácie GHS OSN a CLP

VRM	„Bez kategórie“	Predpoklad nie je možný
VRM1 – EpiOcular™ EIT (pre oba protokoly)	stredná životaschopnosť tkaniva > 60 %	stredná životaschopnosť tkaniva ≤ 60 %
VRM2 – SkinEthic™ HCE EIT (pre protokol pre kvapaliny)	stredná životaschopnosť tkaniva > 60 %	stredná životaschopnosť tkaniva ≤ 60 %
VRM2 – SkinEthic™ HCE EIT (pre protokol pre tuhé látky)	stredná životaschopnosť tkaniva > 50 %	stredná životaschopnosť tkaniva ≤ 50 %

45. V prípade testovanej chemikálie s jednoznačným výsledkom by mal byť postačujúci jeden test, ktorý zahŕňa použitie aspoň dvoch replikátov tkaniva. V prípadoch s hraničnými výsledkami, napríklad ak sa nezhodujú merania replikátov a/alebo ak sa stredná percentuálna hodnota životaschopnosti tkaniva rovná 60 ±5 % (VRM1 a v prípade protokolu pre kvapaliny aj VRM2) alebo 50 ±5 % (VRM2 v prípade protokolu pre tuhé látky), však treba zvážiť vykonanie druhého testu, ako aj tretieho testu, ak sa výsledky z prvých dvoch testov nezhodujú.

46. Vo vhodných a v odôvodnených prípadoch možno pre špecifické typy zmesí zvážiť odlišné hraničné percentuálne hodnoty životaschopnosti tkaniva, na základe ktorých sa rozlišuje medzi klasifikovanými a neklasifikovanými testovanými chemikáliami, aby sa zvýšila celková výkonnosť tejto testovacej metódy pri týchto typoch zmesí (pozri odsek 14). Referenčné chemikálie môžu byť užitočné na posudzovanie potenciálu neznámych testovaných chemikálií alebo triedy výrobkov spôsobiť vážne poškodenie očí/podráždenie očí, alebo na posudzovanie potenciálu relatívnej toxicity pre oči v prípade klasifikovanej chemikálie v rámci špecifického rozsahu kladných reakcií.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje

47. Údaje z jednotlivých replikovaných tkanív v testovacom cykle (napr. hodnoty OD/plochy píku formazánu MTT a vypočítané údaje o percentuálnych hodnotách životaschopnosti tkaniva pre testovanú chemikáliu a kontroly, ako aj konečný predpoklad na základe testovacej metódy RhCE) je potrebné zaznamenať do tabuľky pre každú testovanú chemikáliu, podľa potreby vrátane údajov z opakovaných testov. Okrem toho je potrebné uviesť strednú percentuálnu hodnotu životaschopnosti tkaniva a rozdiel v životaschopnosti medzi dvoma replikátmi tkaniva (ak n = 2 replikované tkanivá) alebo SD (ak n ≥ 3 replikované tkanivá) pre každú jednotlivú testovanú chemikáliu a kontrolu. Pre každú testovanú chemikáliu je potrebné uviesť akékoľvek pozorované interferencie testovanej chemikálie s meraním formazánu MTT v dôsledku priamej redukcie MTT a/alebo farebnej interferencie.

Správa o teste

48. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

▼**M8**

Testovaná chemikália

Jednozložkové látky

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, registračné čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— skupenstvo, prchavosť, pH, koeficient LogP, molekulová hmotnosť, chemická trieda a v dostupnom rozsahu ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti súvisiace s uskutočňovaním štúdie,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— v uplatniteľnom prípade úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie),

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi

— čo najpodrobnejšia charakterizácia, napr. prostredníctvom chemickej identity (pozri vyššie), čistoty, kvantitatívneho výskytu a relevantných fyzikálno-chemických vlastností (pozri vyššie) zložiek v dostupnom rozsahu,

— skupenstvo a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti súvisiace s uskutočňovaním štúdie v dostupnom rozsahu,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— v uplatniteľnom prípade úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie),

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu.

Látky pozitívnej a negatívnej kontroly

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, registračné čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— skupenstvo, prchavosť, molekulová hmotnosť, chemická trieda a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti súvisiace s uskutočňovaním štúdie v dostupnom rozsahu,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— v uplatniteľnom prípade úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie),

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— odôvodnenie použitia odlišnej negatívnej kontroly než ultračistej H_2O alebo DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}, ak sa uplatňuje,

— odôvodnenie použitia odlišnej pozitívnej kontroly než čistého metylacetátu, ak sa uplatňuje,

— odkaz na historické výsledky pre pozitívne a negatívne kontroly dokazujúce vhodné kritériá prijateľnosti testovacieho cyklu.

Informácie týkajúce sa objednávateľa a testovacieho zariadenia

— meno a adresa objednávateľa, testovacieho zariadenia a vedúceho štúdie.

— *Model tkaniva RhCE a použitý protokol (podľa potreby poskytujúci odôvodnenie rozhodnutí)*

▼**M8**

Podmienky testovacej metódy

— použitý model tkaniva RhCE vrátane čísla šarže,

— vlnová dĺžka a pásmový priepust (ak sa uplatňuje) používané pri kvantifikácii formazánu MTT a rozsah linearity meracieho zariadenia (napr. spektrofotometra),

— opis metódy použitej na kvantifikáciu formazánu MTT,

— opis použitého systému HPLC/UPLC spektrofotometrie, ak sa uplatňuje,

— úplné podporné údaje o použitom modeli tkaniva RhCE vrátane jeho výkonnosti. Údaje by mali predovšetkým zahŕňať:

i) kontrolu kvality z hľadiska životaschopnosti (dodávateľ);

ii) životaschopnosť v podmienkach testovacej metódy (používateľ);

iii) kontrolu kvality bariérovej funkcie;

iv) morfológiu, ak je k dispozícii;

v) reprodukovateľnosť a schopnosť stanoviť predpoklad;

vi) ďalšie kontroly kvality (QC) modelu tkaniva RhCE, ak sú dostupné;

— odkaz na historické údaje o modeli tkaniva RhCE; Údaje by mali predovšetkým zahŕňať: prijateľnosť údajov o kontrole kvality s odkazom na historické údaje o šaržiach,

— vyhlásenie o tom, že testovacie zariadenie preukázalo spôsobilosť pri používaní testovacej metódy pred začatím bežného používania otestovaním chemikálií na preukázanie spôsobilosti.

Kritériá prijateľnosti testovacieho cyklu a testu

— stredné hodnoty a rozsahy prijateľnosti pozitívnych a negatívnych kontrol na základe historických údajov,

— prijateľná variabilita medzi replikátmi tkaniva pre pozitívne a negatívne kontroly,

— prijateľná variabilita medzi replikátmi tkaniva pre testovanú chemikáliu.

Testovací postup

— podrobné informácie o použitom testovacom postupe,

— použité dávky testovanej chemikálie a kontrolných látok,

— trvanie a teplota počas doby expozície, postexpozičného ponorenia a postexpozičnej inkubácie (podľa potreby),

— opis všetkých modifikácií testovacieho postupu,

▼**M8**

— uvedenie kontrol použitých pre priame redukčné činidlá MTT a/alebo zafarbené testované chemikálie, ak je to možné,

— počet použitých replikátov tkaniva na každú testovanú chemikáliu a kontroly (pozitívna kontrola, negatívna kontrola, NSMTT, NSC_{living} a NSC_{killed}, ak sa uplatňujú).

Výsledky

— tabuľky s údajmi z jednotlivých testovaných chemikálií a kontrolných látok pre každý testovací cyklus (v relevantných prípadoch vrátane opakovaných pokusov) a každé meranie replikátu vrátane hodnoty OD alebo plochy píku formazánu MTT, percentuálnej hodnoty životaschopnosti tkaniva, strednej percentuálnej hodnoty životaschopnosti tkaniva, rozdielu medzi replikátmi tkaniva alebo SD a konečného predpokladu,

— ak je to možné, výsledky kontrol použitých v prípade chemikálií priamo redukujúcich MTT a/alebo zafarbených testovaných chemikálií vrátane hodnoty OD alebo plochy píku formazánu MTT, hodnôt %NSMTT, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, rozdielu medzi replikátmi tkaniva alebo SD, konečnej správnej percentuálnej hodnoty životaschopnosti tkaniva a konečného predpokladu,

— výsledky získané na základe testovaných chemikálií a kontrolných látok vzhľadom na určené kritériá prijateľnosti testovacieho cyklu a testu,

— opis ďalších pozorovaných účinkov, napr. zafarbenia tkanív farebnou testovanou chemikáliou.

Diskusia o výsledkoch

Záver

LITERATÚRA

(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. K dispozícii na adrese: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Kapitola B.5 tejto prílohy, Akútne podráždenie/poleptanie oka.

(3) Kapitola B.47 tejto prílohy, Testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky na identifikáciu i) chemikálií vyvolávajúcich vážne poškodenie očí a ii) chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí

(4) Kapitola B.48 tejto prílohy, Testovacia metóda izolovaného kuracieho oka na identifikáciu i) chemikálií vyvolávajúcich vážne poškodenie očí a ii) chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu.

(5) Kapitola B.61 tejto prílohy, Testovacia metóda úniku fluoresceínu na zisťovanie očných žieravín a silne dráždivých látok.

▼**M8**

(6) Kapitola B.68 tejto prílohy, Testovacia metóda krátkodobej expozície *in vitro* na identifikáciu i) chemikálií vyvolávajúcich vážne poškodenie očí a ii) chemikálií, ktoré si nevyžadujú klasifikáciu ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí.

(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 28 125 EN; doi:10.2787/41680. K dispozícii na adrese: 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 28 173 EN; doi: 10.2787/043697. K dispozícii na adrese: 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 28 175 EN; doi: 10.2787/390390. K dispozícii na adrese: 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, s. 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, s. 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, s. 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. K dispozícii na adrese: [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. K dispozícii na adrese: 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. K dispozícii na adrese: 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

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o mieru výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (18).

Referenčná chemikália: chemikália, ktorá sa používa ako štandard na porovnávanie s testovanou chemikáliou. Referenčná chemikália by mala mať tieto vlastnosti: i) konzistentné a spoľahlivé zdroje na identifikáciu a charakterizáciu; ii) štruktúrnu, funkčnú a/alebo chemickú podobnosť alebo podobnosť z hľadiska triedy výrobku s chemikáliami, ktoré sa budú testovať; iii) známe fyzikálnochemické vlastnosti; iv) podporné údaje o známych účinkoch a v) známu potenciu v rozsahu želanej reakcie.

Prístup zdola nahor: prístup v postupných krokoch použitý v prípade testovanej chemikálie, o ktorej sa predpokladá, že si nevyžaduje klasifikáciu a označovanie ako chemikália spôsobujúca podráždenie očí alebo vážne poškodenie očí. Začína sa odlíšením chemikálií nevyžadujúcich klasifikáciu a označovanie (negatívny výsledok) od ostatných chemikálií (pozitívny výsledok).

Chemikália: látka alebo zmes.

Zhoda: Pozri „presnosť“.

Rohovka: priehľadná časť prednej strany očnej gule, ktorá pokrýva dúhovku a zrenicu a prepúšťa svetlo do vnútra oka.

CV: variačný koeficient.

Dev: odchýlka.

EIT: test očnej dráždivosti.

EURL ECVAM: referenčné laboratórium Európskej únie pre alternatívy k testovaniu na zvieratách.

Podráždenie očí: vyvolanie zmien v oku po aplikácii testovanej chemikálie na predný povrch oka, ktoré sú do 21 dní po aplikácii úplne vratné. Pojem možno použiť zameniteľne s pojmom „vratné účinky na oči“ a kategóriou 2 podľa GHS OSN/CLP.

ET_{50}: expozičný čas potrebný na zníženie životaschopnosti tkaniva o 50 % pri použití referenčnej chemikálie v špecifickej pevne určenej koncentrácii.

Miera falošnej negativity: podiel všetkých pozitívnych látok, ktoré sú testovacou metódou nesprávne identifikované ako negatívne. Je to jeden z ukazovateľov výkonnosti testovacej metódy.

Miera falošnej pozitivity: podiel všetkých negatívnych látok, ktoré sú testovacou metódou nesprávne identifikované ako pozitívne. Je to jeden z ukazovateľov výkonnosti testovacej metódy.

Nebezpečnosť: inherentná vlastnosť činidla, prípadne situácia, ktorá môže vyvolať nepriaznivé účinky pri expozícii organizmu, systému alebo (sub)populácie účinkom daného činidla.

HCE: epitel ľudskej rohovky SkinEthic™.

▼**M8**

HPLC: vysokoúčinná kvapalinová chromatografia.

IC_{50}: koncentrácia, pri ktorej referenčná chemikália znižuje životaschopnosť tkanív o 50 % po pevne stanovenom expozičnom čase (napr. po 30-minútovom ošetrení pomocou SDS).

Nekonečná dávka: množstvo testovanej chemikálie aplikovanej na model tkaniva RhCE, ktoré prekračuje množstvo potrebné na úplné a rovnomerné pokrytie povrchu epitelu.

Nevratné účinky na oči: pozri „vážne poškodenie očí“.

LLOQ: dolný limit kvantifikácie.

LogP: logaritmus rozdeľovacieho koeficientu oktanol/voda.

Zmes: zmes alebo roztok zložený z dvoch alebo viacerých látok.

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej 80 hm. %.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii ≥ 10 hm. % a < 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo k chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

MTT: 2,5-difenyl-3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)tetrazólium-bromid, tiazolylová modrá tetrazólium-bromid.

Negatívna kontrola: vzorka obsahujúca všetky zložky testovacieho systému a ošetrená látkou, ktorá je známa tým, že nevyvoláva pozitívnu reakciu v testovacom systéme. Táto vzorka sa spracuje so vzorkami ošetrenými testovanou chemikáliou, ako aj inými kontrolnými vzorkami a slúži na určenie 100 % životaschopnosti tkaniva.

Neklasifikované: chemikálie neklasifikované ako chemikálie spôsobujúce podráždenie očí (kategória 2 podľa GHS OSN/CLP, kategória 2A alebo 2B podľa GHS OSN) alebo vážne poškodenie očí (kategória 1 podľa GHS OSN/CLP). Pojem možno použiť zameniteľne s označením „bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP.

NSC_{killed}: nešpecifická farba v usmrtených tkanivách.

NSC_{living}: nešpecifická farba v živých tkanivách.

NSMTT: nešpecifická redukcia MTT.

OD: optická hustota.

Výkonnostné normy: normy založené na validovanej testovacej metóde, ktorá sa považovala za vedecky platnú, ktoré slúžia ako základ na hodnotenie porovnateľnosti navrhovanej testovacej metódy, ktorá je mechanicky a funkčne podobná. Patria sem: i) nevyhnutné zložky testovacej metódy; ii) minimálny zoznam referenčných chemikálií vybraných spomedzi chemikálií používaných na preukázanie prijateľnej výkonnosti validovanej testovacej metódy a iii) porovnateľné úrovne presnosti a spoľahlivosti založené na tom, čo sa získalo pri validovanej testovacej metóde, ktoré by navrhovaná testovacia metóda mala preukázať pri hodnotení pomocou minimálneho zoznamu referenčných chemikálií (18).

▼**M8**

Pozitívna kontrola: vzorka obsahujúca všetky zložky testovacieho systému a ošetrená látkou, ktorá je známa tým, že vyvoláva pozitívnu reakciu v testovacom systéme. Táto vzorka sa spracuje so vzorkami ošetrenými testovanou chemikáliou a inými kontrolnými vzorkami. Aby bolo možné vyhodnotiť variabilitu reakcie na pozitívnu kontrolu v čase, rozsah pozitívnej reakcie by nemal byť nadmerný.

Relevantnosť: opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej sa testom správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testovacej metódy (18).

Spoľahlivosť: vyjadruje rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Hodnotí sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a vnútrolaboratórnej opakovateľnosti (18).

Náhradný test: test navrhnutý ako náhrada za test, ktorý sa bežne používa, ktorý je schválený na identifikáciu nebezpečnosti a/alebo hodnotenie rizika a o ktorom sa rozhodlo, že poskytuje rovnakú alebo zvýšenú úroveň ochrany zdravia ľudí alebo zvierat alebo životného prostredia v porovnaní so schváleným testom pre všetky možné testované situácie a chemikálie (18).

Reprodukovateľnosť: zhoda výsledkov získaných opakovaným testovaním tej istej testovanej chemikálie s použitím toho istého testovacieho protokolu (pozri „spoľahlivosť“) (18).

Vratné účinky na oči: pozri „podráždenie očí“.

RhCE: rekonštruovaný epitel podobný ľudskej rohovke.

Testovací cyklus: testovací cyklus pozostáva z jednej alebo viacerých testovaných chemikálií testovaných súbežne s negatívnou kontrolou a s pozitívnou kontrolou.

SD: štandardná odchýlka.

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych testovaných chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (18).

▼M8

Vážne poškodenie očí: poškodenie očného tkaniva alebo veľmi výrazné zhoršenie zraku, ku ktorému dôjde po aplikácii testovanej látky na predný povrch oka, ktoré nie je úplne vratné do 21 dní po aplikácii. Pojem možno použiť zameniteľne s pojmami „nevratné účinky na oči“ a „kategória 1 podľa GHS OSN/CLP“.

Štandardné operačné postupy (SOP): formálne písomné postupy, ktoré podrobne opisujú, ako sa vykonávajú konkrétne laboratórne operácie – bežné aj špecifické pre príslušný test. Vyžadujú sa v rámci správnej laboratórnej praxe.

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych testovaných chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (18).

Látka: chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie ich stability a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ktorý však nezahŕňa žiadne rozpúšťadlá, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo zmeny jej zloženia.

Test: jedna testovaná chemikália, ktorá sa súbežne testuje najmenej v dvoch replikátoch tkaniva, ako sa vymedzuje v príslušných SOP.

Životaschopnosť tkaniva: parameter na meranie celkovej aktivity bunkovej populácie v rekonštruovanom tkanive z hľadiska schopnosti buniek redukovať vitálne farbivo MTT, ktorý v závislosti od meraného sledovaného parametra a od použitej koncepcie testu zodpovedá celkovému počtu a/alebo vitalite živých buniek.

Prístup zhora nadol: prístup v postupných krokoch použitý v prípade testovanej chemikálie, o ktorej sa predpokladá, že spôsobuje vážne poškodenie očí. Začína sa odlíšením chemikálií spôsobujúcich vážne poškodenie očí (pozitívny výsledok) od ostatných chemikálií (negatívny výsledok).

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Stratégia viacúrovňového testovania: stratégia postupného testovania, pri ktorej sa testovacie metódy používajú postupne. Všetky existujúce informácie o testovanej chemikálii sa kontrolujú na jednotlivých úrovniach analýzou váhy dôkazov, pričom sa pred prechodom na ďalšiu úroveň v rámci stratégie zisťuje, či je k dispozícii dostatok informácií na rozhodnutie o klasifikácii nebezpečnosti. Ak potenciál nebezpečnosti/potenciu testovanej chemikálie možno stanoviť na základe existujúcich informácií, nevyžaduje sa žiadne ďalšie testovanie (18).

ULOQ: horný limit kvantifikácie.

Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií OSN (GHS OSN): systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálnej, zdravotnej a environmentálnej nebezpečnosti a ich označovanie zodpovedajúcimi komunikačnými prvkami, ako sú piktogramy, výstražné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o nepriaznivých účinkoch daných chemikálií v záujme ochrany osôb (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a subjektov reakcie na núdzové situácie) a životného prostredia (1).

Kategória 1 podľa GHS OSN a CLP: pozri „vážne poškodenie očí“.

Kategória 2 podľa GHS OSN a CLP: pozri „podráždenie očí“.

„Bez kategórie“ podľa GHS OSN a CLP: chemikálie, ktoré nespĺňajú požiadavky na klasifikáciu v kategórii 1 alebo 2 podľa GHS OSN/CLP (prípadne v kategórii 2A alebo 2B podľa GHS OSN). Pojem možno použiť zameniteľne s pojmom „neklasifikované“.

UPLC: ultra vysokoúčinná kvapalinová chromatografia.

▼M8

UVCB:: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

Platná testovacia metóda: testovacia metóda, ktorá sa na daný účel považuje za dostatočne relevantnú a spoľahlivú a ktorá je založená na vedecky podložených zásadách. Testovacia metóda nie je nikdy platná v absolútnom zmysle, ale len vo vzťahu k vymedzenému účelu (18).

Validovaná testovacia metóda: testovacia metóda, v súvislosti s ktorou sa ukončili validačné štúdie na stanovenie relevantnosti (vrátane presnosti) a spoľahlivosti na konkrétny účel. Je dôležité poznamenať, že validovaná testovacia metóda nemusí mať dostatočnú výkonnosť, pokiaľ ide o presnosť a spoľahlivosť, aby bola prijateľná pre navrhovaný účel (18).

VRM: validovaná referenčná metóda.

VRM1: test EpiOcular™ EIT sa označuje ako validovaná referenčná metóda 1.

VRM2: test SkinEthic™ HCE EIT sa označuje ako validovaná referenčná metóda 2.

Analýza váhy dôkazov: postup posudzovania silných a slabých stránok rôznych informácií na dosiahnutie a podloženie záveru, pokiaľ ide o potenciál nebezpečnosti testovanej látky.

▼M8

Dodatok 2

HLAVNÉ TESTOVACIE ZLOŽKY TESTOV RHCE VALIDOVANÝCH NA IDENTIFIKÁCIU CHEMIKÁLIÍ, KTORÉ SI NEVYŽADUJÚ KLASIFIKÁCIU A OZNAČOVANIE AKO CHEMIKÁLIE SPÔSOBUJÚCE PODRÁŽDENIE OČÍ ALEBO VÁŽNE POŠKODENIE OČÍ

Testovacie zložky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Protokoly	Kvapaliny (umožňujúce pipetovanie pri teplote 37 ±1 °C alebo nižšej počas 15 minút)	Tuhé látky (neumožňujúce pipetovanie)	Kvapaliny a viskózne látky (umožňujúce pipetovanie)	Tuhé látky (neumožňujúce pipetovanie)
Povrch modelu	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Počet replikátov tkaniva	najmenej 2	najmenej 2	najmenej 2	najmenej 2
Predbežné overenie výskytu farebnej interferencie	50 µl + 1 ml H_2O na 60 min. pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 % (bezfarebné testované chemikálie) alebo 50 µl + 2 ml izopropanolu na 2 – 3 h pri izbovej teplote (farebné testované chemikálie) → Ak je OD testovanej chemikálie pri vlnovej dĺžke 570 ±20 nm po odpočítaní OD izopropanolu alebo vody > 0,08 (čo zodpovedá približne 5 % strednej hodnoty OD negatívnej kontroly), je potrebné uskutočniť živé prispôsobené kontroly.	50 mg + 1 ml H_2O na 60 min. pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 % (bezfarebné testované chemikálie) a/alebo 50 mg + 2 ml izopropanolu na 2 – 3 h pri izbovej teplote (farebné a bezfarebné testované chemikálie) → Ak je OD testovanej chemikálie pri vlnovej dĺžke 570 ±20 nm po odpočítaní OD izopropanolu alebo vody > 0,08 (čo zodpovedá približne 5 % strednej hodnoty OD negatívnej kontroly), je potrebné uskutočniť živé prispôsobené kontroly.	10 µl + 90 µl H_2O s miešaním počas 30 ±2 min. pri izbovej teplote (18 – 28 °C) → Ak je testovaná chemikália farebná, je potrebné uskutočniť živé prispôsobené kontroly.	10 mg + 90 µl H_2O s miešaním počas 30 ±2 min. pri izbovej teplote → Ak je testovaná chemikália farebná, je potrebné uskutočniť živé prispôsobené kontroly.

▼M8

Testovacie zložky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Predbežné overenie priamej redukcie MTT	50 µl + 1 ml roztoku MTT s koncentráciou 1 mg/ml počas 180 ±15 min. pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 % → Ak sa roztok sfarbí na modro/fialovo, je potrebné uskutočniť prispôsobené kontroly usmrtené zmrazením (ako negatívna kontrola sa používa 50 µl sterilnej deionizovanej vody v roztoku MTT)	50 mg + 1 ml roztoku MTT s koncentráciou 1 mg/ml počas 180 ±15 min. pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 % → Ak sa roztok sfarbí na modro/fialovo, je potrebné uskutočniť prispôsobené kontroly usmrtené zmrazením (ako negatívna kontrola sa používa 50 µl sterilnej deionizovanej vody v roztoku MTT)	30 µl + 300 µl roztoku MTT s koncentráciou 1 mg/ml počas 180 ±15 min. pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 % → Ak sa roztok sfarbí na modro/fialovo, je potrebné uskutočniť prispôsobené kontroly usmrtené vo vode (ako negatívna kontrola sa používa 30 µl sterilnej deionizovanej vody v roztoku MTT)	30 mg + 300 µl roztoku MTT s koncentráciou 1 mg/ml počas 180 ±15 min. pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 % → Ak sa roztok sfarbí na modro/fialovo, je potrebné uskutočniť prispôsobené kontroly usmrtené vo vode (ako negatívna kontrola sa používa 30 µl sterilnej deionizovanej vody v roztoku MTT)
Predpríprava	20 µl DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+} počas 30 ±2 min. pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %, chránené pred svetlom.	20 µl DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+} počas 30 ±2 min. pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %, chránené pred svetlom.	—	—
Dávky pri ošetrení a aplikácia	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) pomocou kalibrovaného nástroja (napr. zarovnanej lyžičky kalibrovanej tak, aby obsahovala 50 mg chloridu sodného).	10 µl DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+} + 30 ±2 µl (60 µl/cm^2) V prípade viskóznych látok použite nylonové sitko	30 µl DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+} + 30 ±2 mg (60 mg/cm^2)
Expozičný čas a teplota	30 min. (±2 min.) v kultivačnom médiu pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %	6 hodín (±0,25 h) v kultivačnom médiu pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %	30 min. (±2 min.) v kultivačnom médiu pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %	4 hodiny (±0,1 h) v kultivačnom médiu pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %
Preplachovanie pri izbovej teplote	Trikrát v 100 ml DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}	Trikrát v 100 ml DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}	20 ml DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}	25 ml DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}
Postexpozičné ponorenie	12 min. (±2 min.) pri izbovej teplote v kultivačnom médiu	25 min. (±2 min.) pri izbovej teplote v kultivačnom médiu	30 min. (±2 min.) pri 37 °C, 5 % CO_2, 95 % relatívnej vlhkosti v kultivačnom médiu	30 min. (±2 min.) pri izbovej teplote v kultivačnom médiu

▼M8

Testovacie zložky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Postexpozičná inkubácia	120 min. (±15 min.) v kultivačnom médiu pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %	18 h (±0,25 h) v kultivačnom médiu pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %	žiadna	18 h (±0,5 h) v kultivačnom médiu pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %
Negatívna kontrola	50 µl H_2O Testované súbežne	50 µl H_2O Testované súbežne	30 ±2 µl DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+} Testované súbežne	30 ±2 µl DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+} Testované súbežne
Pozitívna kontrola	50 µl metylacetátu Testované súbežne	50 µl metylacetátu Testované súbežne	30 ±2 µl metylacetátu Testované súbežne	30 ±2 µl metylacetátu Testované súbežne
Roztok MTT	300 µl s koncentráciou 1 mg/ml	300 µl s koncentráciou 1 mg/ml	300 µl s koncentráciou 1 mg/ml	300 µl s koncentráciou 1 mg/ml
Inkubačný čas a teplota pri použití MTT	180 min. (±15 min.) pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %	180 min. (±15 min.) pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %	180 min. (±15 min.) pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %	180 min. (±15 min.) pri 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, relatívna vlhkosť ≥ 95 %
Extrakčné rozpúšťadlo	2 ml izopropanolu (extrakcia z hornej a spodnej vloženej časti prepichnutím tkaniva)	2 ml izopropanolu (extrakcia z hornej a spodnej vloženej časti prepichnutím tkaniva)	1,5 ml izopropanolu (extrakcia z hornej a spodnej vloženej časti)	1,5 ml izopropanolu (extrakcia zo spodnej vloženej časti)
Čas extrakcie a teplota	2 – 3 h s pretrepávaním (~120 ot./min.) pri izbovej teplote alebo do ďalšieho dňa pri teplote 4 – 10 °C	2 – 3 h s pretrepávaním (~120 ot./min.) pri izbovej teplote alebo do ďalšieho dňa pri teplote 4 – 10 °C	4 h s pretrepávaním (~120 ot./min.) pri izbovej teplote alebo najmenej do ďalšieho dňa bez pretrepávania pri teplote 4 – 10 °C	Najmenej 2 h s pretrepávaním (~120 ot./min.) pri izbovej teplote
Určenie hodnoty OD	570 nm (550 – 590 nm) bez referenčného filtra	570 nm (550 – 590 nm) bez referenčného filtra	570 nm (540 – 600 nm) bez referenčného filtra	570 nm (540 – 600 nm) bez referenčného filtra
Kontrola kvality tkaniva	Ošetrenie pomocou 100 µl látky Triton X-100 s koncentráciou 0,3 obj. % 12,2 min. ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min.	Ošetrenie pomocou 100 µl látky Triton X-100 s koncentráciou 0,3 obj. % 12,2 min. ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min.	30-minútové ošetrenie pomocou SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	30-minútové ošetrenie pomocou SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

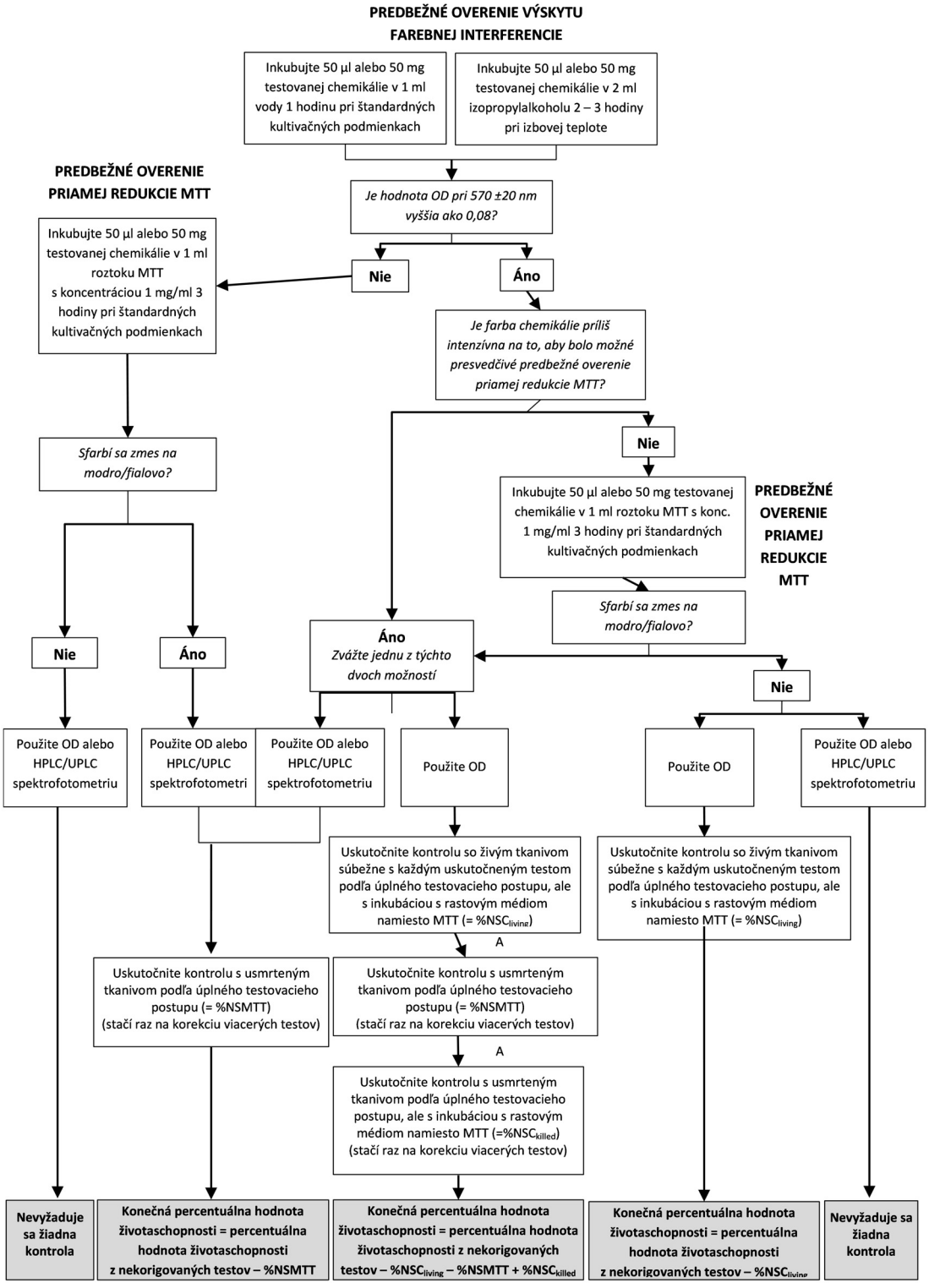
▼M8

Testovacie zložky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Kritériá prijateľnosti	1. Stredná hodnota OD replikátov tkaniva ošetrených pomocou negatívnej kontroly má byť > 0,8 a < 2,5. 2. Stredná životaschopnosť replikátov tkaniva vystavených na 30 minút pozitívnej kontrole, vyjadrená ako percentuálna hodnota negatívnej kontroly, má byť < 50 %. 3. Rozdiel v životaschopnosti medzi dvoma replikátmi tkaniva má byť menej ako 20 %.	1. Stredná hodnota OD replikátov tkaniva ošetrených pomocou negatívnej kontroly má byť > 0,8 a < 2,5. 2. Stredná životaschopnosť replikátov tkaniva vystavených na 6 hodín pozitívnej kontrole, vyjadrená ako percentuálna hodnota negatívnej kontroly, má byť < 50 %. 3. Rozdiel v životaschopnosti medzi dvoma replikátmi tkaniva má byť menej ako 20 %.	1. Stredná hodnota OD replikátov tkaniva ošetrených pomocou negatívnej kontroly má byť > 1,0 a ≤ 2,5. 2. Stredná životaschopnosť replikátov tkaniva vystavených na 30 minút pozitívnej kontrole, vyjadrená ako percentuálna hodnota negatívnej kontroly, má byť ≤ 30 %. 3. Rozdiel v životaschopnosti medzi dvoma replikátmi tkaniva má byť menej ako 20 %.	1. Stredná hodnota OD replikátov tkaniva ošetrených pomocou negatívnej kontroly má byť > 1,0 a ≤ 2,5. 2. Stredná životaschopnosť replikátov tkaniva vystavených na 4 hodiny pozitívnej kontrole, vyjadrená ako percentuálna hodnota negatívnej kontroly, má byť ≤ 20 %. 3. Rozdiel v životaschopnosti medzi dvoma replikátmi tkaniva má byť menej ako 20 %.

▼**M8**

Dodatok 3

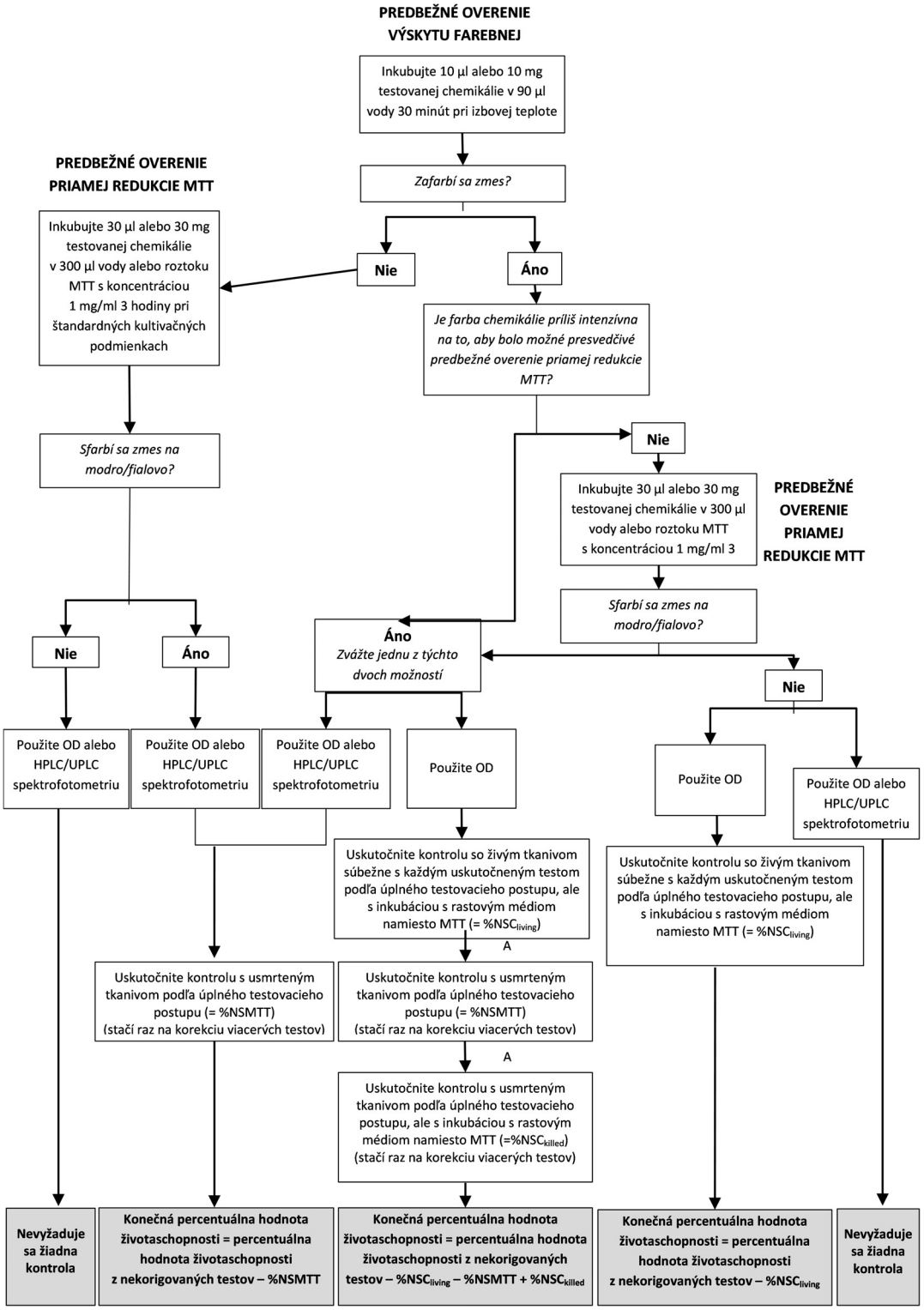
ILUSTRATÍVNE VÝVOJOVÉ DIAGRAMY POSKYTUJÚCE USMERNENIE O TOM, AKO IDENTIFIKOVAŤ A ZOHĽADNIŤ PRIAME REDUKČNÉ ČINIDLÁ MTT A/ALEBO CHEMIKÁLIE SPÔSOBUJÚCE FAREBNÚ INTERFERENCIU NA ZÁKLADE ŠTANDARDNÝCH OPERAČNÝCH POSTUPOV PRE VRM1



▼**M8**

Dodatok 4

ILUSTRATÍVNE VÝVOJOVÉ DIAGRAMY POSKYTUJÚCE USMERNENIE O TOM, AKO IDENTIFIKOVAŤ A ZOHĽADNIŤ PRIAME REDUKČNÉ ČINIDLÁ MTT A/ALEBO CHEMIKÁLIE SPÔSOBUJÚCE FAREBNÚ INTERFERENCIU NA ZÁKLADE ŠTANDARDNÝCH OPERAČNÝCH POSTUPOV PRE VRM2



▼**M8**

Dodatok 5

KĽÚČOVÉ PARAMETRE A KRITÉRIÁ PRIJATEĽNOSTI NA KVALIFIKÁCIU SYSTÉMU HPLC/UPLC SPEKTROFOTOMETRIE NA MERANIE FORMAZÁNU MTT ZÍSKANÉHO Z MODELOV TKANIVA RHCE

Parameter	Protokol odvodený z usmernenia FDA (36) (38)	Kritériá prijateľnosti
Selektívnosť	Analýza izopropanolu, living blank (izopropanolový extrakt zo živých modelov tkanív RhCE bez ošetrenia), dead blank (izopropanolový extrakt z usmrtených modelov tkanív RhCE bez ošetrenia) a farbiva (napr. metylénová modrá)	Plocha interferencie ($Area_{interference}$) ≤ 20 % plochy LLOQ ($Area_{LLOQ}$) ([1])
Exaktnosť	Kontroly kvality (t. j. formazán MTT v objeme 1,6 µg/ml, 16 µg/ml a 160 µg/ml) v izopropanole (n = 5)	CV ≤ 15 % alebo ≤ 20 % v prípade LLOQ
Presnosť	Kontroly kvality v izopropanole (n = 5)	% Dev ≤ 15 % alebo ≤ 20 % v prípade LLOQ
Matricový efekt	Kontroly kvality v living blank (n = 5)	85 % ≤ % matricového efektu ≤ 115 %
Prenos	Analýza izopropanolu podľa normy ULOQ ([2])	Plocha interferencie ($Area_{interference}$) ≤ 20 % plochy LLOQ ($Area_{LLOQ}$)
Reprodukovateľnosť (v priebehu dňa)	3 nezávislé kalibračné krivky (na základe 6 po sebe nasledujúcich riedení formazánu MTT v izopropanole v pomere 1:3, začínajúc pri ULOQ, t. j. 200 µg/ml); Kontroly kvality v izopropanole (n = 5)	Kalibračné krivky: % Dev ≤ 15 % alebo ≤ 20 % v prípade LLOQ Kontroly kvality: % Dev ≤ 15 % a CV ≤ 15 %
Reprodukovateľnosť (v priebehu dní)	Deň 1: 1 kalibračná krivka a kontroly kvality v izopropanole (n = 3) Deň 2: 1 kalibračná krivka a kontroly kvality v izopropanole (n = 3) Deň 3: 1 kalibračná krivka a kontroly kvality v izopropanole (n = 3)	
Krátkodobá stabilita formazánu MTT v extrakte tkaniva RhCE	Kontroly kvality v living blank (n = 3) analyzovanej v deň prípravy a po 24 hodinách skladovania pri izbovej teplote	% Dev ≤ 15 %
Dlhodobá stabilita formazánu MTT v extrakte tkaniva RhCE, ak je to potrebné	Kontroly kvality v living blank (n = 3) analyzovanej v deň prípravy a po niekoľkých dňoch skladovania pri teplote –20 °C	% Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: dolný limit kvantifikácie, vymedzený tak, aby zahŕňal 1 – 2 % životaschopnosť tkaniva, t. j. 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ: horný limit kvantifikácie, vymedzený tak, aby bol najmenej dvojnásobne vyšší než najvyššia očakávaná koncentrácia formazánu MTT v extraktoch izopropanolu z negatívnych kontrol (~70 µg/ml pri VRM), t. j. 200 µg/ml.

▼M8

B.70. **SKÚŠKY *IN VITRO* S VYUŽITÍM ĽUDSKÉHO REKOMBINANTNÉHO ESTROGÉNOVÉHO RECEPTORA (hrER) NA ZISŤOVANIE CHEMIKÁLIÍ S AFINITOU K ESTROGÉNOVÉMU RECEPTORU**

VŠEOBECNÝ ÚVOD

Usmernenia OECD na vykonávanie testov výkonnosti

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 493 (2015). TG 493 je usmernenie na vykonávanie testov výkonnosti (PBTG), v ktorom sa opisuje metodika ľudských rekombinantných skúšok *in vitro* na zisťovanie látok s afinitou k estrogénovému receptoru (skúšky väzby na hrER). Obsahuje dve mechanicky a funkčne podobné skúšky na identifikáciu látok vytvárajúcich väzbu na estrogénový receptor (t. j. ERα) a malo by uľahčiť vývoj nových podobných alebo modifikovaných skúšok v súlade so zásadami validácie stanovenými v usmerňovacom dokumente OECD o validácii a medzinárodnom uznávaní nových a aktualizovaných testovacích metód na posúdenie nebezpečnosti (1). Plne validované referenčné testovacie metódy (dodatok 2 a dodatok 3), ktoré poskytujú základ pre toto PBTG, sú:

— Freybergerova-Wilsonova (FW) skúška *in vitro* väzby na estrogénový receptor (ER) pomocou úplného ľudského rekombinantného ERα (2) a

— skúška *in vitro* väzby na estrogénový receptor (ER) organizácie CERI (Chemicals Evaluation and Research Institute) pomocou ľudskej rekombinantnej bielkoviny s doménou viažucou ligand (2).

K dispozícii sú výkonnostné normy (PS) (3) s cieľom uľahčiť vývoj a validáciu podobných testovacích metód pre rovnaký sledovaný parameter nebezpečnosti, ktoré umožňujú včasnú zmenu PBTG 493 tak, aby bolo možné k aktualizovanému PBTG pridať nové podobné skúšky. Podobné testovacie skúšky sa však pridajú až po preskúmaní a súhlase zo strany OECD, že sú splnené výkonnostné normy. Skúšky zahrnuté do TG 493 môžu byť použité bez rozdielu na riešenie požiadaviek členských štátov OECD týkajúcich sa výsledkov testov v súvislosti s väzbou na estrogénový receptor, pričom sa v nich využíva vzájomné uznávanie údajov OECD.

Súvislosti a zásady skúšok zahrnutých do tejto testovacej metódy

2. OECD v roku 1998 začala činnosť s vysokou prioritou s cieľom vykonať revíziu existujúcich usmernení a vypracovať nové usmernenia na vykonávanie testov na skríning a testovanie potenciálnych endokrinných disruptorov. Koncepčný rámec OECD na testovanie a hodnotenie potenciálnych endokrinných disruptorov bol revidovaný v roku 2012. Pôvodné a revidované koncepčné rámce sú zahrnuté ako prílohy k usmerňovaciemu dokumentu o štandardizovaných usmerneniach na vykonávanie testov na hodnotenie chemikálií ako endokrinných disruptorov (4). Koncepčný rámec tvorí päť úrovní, každá úroveň zodpovedá odlišnej úrovni biologickej zložitosti. Skúšky väzby na ER opísané v tejto testovacej metóde predstavujú úroveň 2, čo zahŕňa „*skúšky in vitro poskytujúce údaje o vybraných endokrinných mechanizmoch/dráhach*“. Táto testovacia metóda je určená pre receptorové testy *in vitro* s cieľom identifikovať ligandy pre ľudský estrogénový receptor alfa (ERα).

▼**M8**

3. Relevantnosť skúšky väzby na ER *in vitro* vzhľadom na biologické funkcie bola jednoznačne preukázaná. Skúšky väzby na ER sú určené na identifikovanie chemikálií, ktoré môžu potenciálne narušiť dráhu estrogénových hormónov, a v uplynulých dvoch desaťročiach sa vo veľkej miere používali na charakterizovanie distribúcie ER v tkanive, ako aj na identifikovanie agonistov/antagonistov ER. Tieto skúšky sa týkajú interakcie medzi ligandom a receptorom, ktorá je počiatočným krokom signálnej dráhy estrogénu a je nevyhnutná pre reprodukčnú funkciu všetkých stavovcov.

4. Interakcia estrogénov s estrogénovými receptormi môže ovplyvniť transkripciu génov riadených estrogénom a vyvolať účinky nesúvisiace s genómom, čo môže viesť k indukcii alebo inhibícii bunkových procesov vrátane tých, ktoré sú potrebné na proliferáciu buniek, normálny vývoj plodu a reprodukčnú funkciu (5) (6) (7). Porušenie normálnych estrogénových systémov môže potenciálne spustiť nežiaduce účinky na normálny vývoj (ontogenézu), reprodukčné zdravie a integritu reprodukčného systému. Neprimeraná signalizačná funkcia ER môže viesť k účinkom, ako sú zvýšené riziko karcinómov závislých od hormónov, oslabená plodnosť a zmeny v raste a vývoji plodu (8).

5. Skúšky väzby *in vitro* sú založené na priamej interakcii látky so špecifickým miestom viazania ligandu a receptora, ktorým sa reguluje génová transkripcia. Hlavná zložka skúšky väzby na ľudský rekombinantný estrogénový receptor alfa (hrERα) slúži na meranie schopnosti ligandu označeného rádioizotopom ([^{3}H]17β-estradiol) viazať sa na ER v prítomnosti zvyšujúcich sa koncentrácií testovanej chemikálie (t. j. konkurenta). Testované chemikálie, ktoré sa vyznačujú vysokou afinitou k ER, si konkurujú s ligandom označeným rádioizotopom pri nižšej koncentrácii v porovnaní s chemikáliami, ktorých afinita k receptoru je nižšia. Táto skúška obsahuje dve hlavné zložky: pokus na základe saturačnej väzby, ktorým sa charakterizujú parametre interakcie medzi receptorom a ligandom a určuje sa špecifickosť ER, po ktorom nasleduje pokus na základe kompetitívnej väzby, ktorým sa charakterizuje vzájomné konkurovanie si testovanej chemikálie a ligandu označeného rádioizotopom pri snahe o naviazanie sa na ER.

6. Validačné štúdie skúšok CERI a FW preukázali ich relevantnosť a spoľahlivosť, pokiaľ ide o ich určený účel (2).

7. Vymedzenie pojmov a skratky použité v tejto testovacej metóde sú uvedené v dodatku 1.

Rozsah a obmedzenia týkajúce sa receptorových testov

8. Tieto skúšky sa navrhujú na účely skríningu a stanovovania priorít, ale môžu poskytnúť aj informácie týkajúce sa molekulárnych iniciačných udalostí (MIE), ktoré možno použiť v analýze váhy dôkazov. Týkajú sa chemickej väzby na doménu viažucu ligand ERα v systéme *in vitro*. Výsledky by teda nemali byť priamo extrapolované na komplexnú signalizáciu a reguláciu intaktného endokrinného systému *in vivo*.

▼M8

9. Naviazanie prirodzeného ligandu, 17β-estradiolu, je počiatočným krokom postupnosti molekulárnych udalostí, ktorým sa aktivuje transkripcia cieľových génov, čo v konečnom dôsledku vedie k fyziologickej zmene (9). Vznik väzby na doménu viažucu ligand ERα sa tak považuje za jeden z kľúčových mechanizmov narušenia endokrinného systému (ED) sprostredkovaného estrogénovým receptorom, hoci existujú aj iné mechanizmy, prostredníctvom ktorých môže dôjsť k narušeniu endokrinného systému, okrem iného napríklad prostredníctvom i) interakcií s inými miestami ERα než s miestom viažucim ligand; ii) interakcií s inými receptormi relevantnými pre estrogénovú signalizáciu, s estrogénovým receptorom spojeným s ERβ a G-bielkovinami, inými receptormi a enzýmovými systémami v rámci endokrinného systému; iii) hormónovej syntézy; iv) metabolickej aktivácie a/alebo inaktivácie hormónov; v) distribúcie hormónov do cieľových tkanív a vi) vylúčenia hormónov z tela. Žiadna zo skúšok v rámci tejto testovacej metódy sa netýka týchto spôsobov účinku.

10. Táto testovacia metóda sa týka schopnosti chemikálií viazať sa na ľudský ERα a nemožno pomocou nej rozlišovať medzi agonistami alebo antagonistami ERα. Tieto skúšky sa netýkajú ďalších následných udalostí, napríklad génovej transkripcie alebo fyziologických zmien. Vzhľadom na to, že počas validácie boli použité iba jednotlivé jednozložkové látky, neriešila sa použiteľnosť na testovanie zmesí. Tieto skúšky sú napriek tomu teoreticky použiteľné aj na testovanie viaczložkových látok a zmesí. Pred použitím tejto testovacej metódy na zmesi s cieľom generovať údaje na zamýšľaný regulačný účel by sa malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na tento účel, a ak áno, tak prečo. Takéto úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi.

11. Bezbunkové receptorové systémy nemajú schopnosť vlastného metabolizmu a neboli validované v kombinácii so systémami s využitím metabolických enzýmov. Mohlo by byť možné začleniť metabolickú aktivitu do návrhu štúdie, vyžadovalo by si to však ďalšie úsilie z hľadiska validácie.

12. Chemikálie, ktoré môžu spôsobovať denaturáciu príslušnej bielkoviny (t. j. receptorovej bielkoviny), napríklad povrchovo aktívne látky alebo chemikálie, ktoré môžu meniť hodnotu pH tlmivého skúšobného roztoku, testovať nemožno, prípadne ich možno testovať len v koncentráciách, pri ktorých nedochádza k takýmto interakciám. Rozsah koncentrácií testovanej chemikálie, ktorý možno testovať pri týchto skúškach, je inak obmedzený jej rozpustnosťou v tlmivom skúšobnom roztoku.

13. Na informačné účely tabuľka 1 poskytuje výsledky testov pre 24 látok, ktoré boli testované v obidvoch plne validovaných skúškach opísaných v tejto testovacej metóde. Z týchto látok je 17 klasifikovaných ako látky vytvárajúce väzbu na ER a 6 je klasifikovaných ako látky nevytvárajúce väzbu na ER na základe publikovaných správ vrátane skúšok *in vitro* transkripčnej aktivácie a/alebo uterotrofickej skúšky (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). V súvislosti s údajmi zhrnutými v tabuľke 1 existovala takmer 100 % zhoda medzi oboma skúškami, pokiaľ ide o klasifikáciu všetkých látok do 10^{-4} M, pričom každá látka bola správne klasifikovaná ako látka vytvárajúca alebo nevytvárajúce väzbu na ER. Doplňujúce informácie o tejto skupine látok, ako aj o ďalších látkach testovaných v skúškach väzby na ER počas validačných štúdií sú uvedené vo výkonnostných normách pre skúšku väzby na hrER (3) v dodatku 2 (tabuľky 1, 2 a 3).

▼M8

Tabuľka 1

Klasifikácia látok ako látok vytvárajúcich alebo nevytvárajúcich väzbu na ER pri testovaní v skúškach FW a CERI väzby na hrER spolu s porovnaním s očakávanou reakciou

	Názov látky	Registračné číslo CAS	Očakávaná reakcia	Skúška FW		Skúška CERI		Chemická trieda podľa MESH	Trieda výrobku
				Rozsah koncentrácií (M)	Klasifikácia	Rozsah koncentrácií (M)	Klasifikácia		
1	17β-estradiol	50-28-2	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	látka vytvárajúca väzbu	steroid	liek, veterinárne činidlo
2	noretynodrel	68-23-5	*látka vytvárajúca väzbu*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	látka vytvárajúca väzbu	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	látka vytvárajúca väzbu	steroid	liek, veterinárne činidlo
3	noretindrón	68-22-4	*látka vytvárajúca väzbu*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	látka vytvárajúca väzbu	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	látka vytvárajúca väzbu	steroid	liek, veterinárne činidlo
4	di-*n*-butyl ftalát	84-74-2	*látka nevytvárajúca väzbu (*)*	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	látka nevytvárajúca väzbu (**) (+)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	látka nevytvárajúca väzbu (**) (+)	uhľovodík (cyklický), ester	zmäkčovadlo, chemický medziprodukt
5	DES	56-53-1	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	uhľovodík (cyklický), fenol	liek, veterinárne činidlo
6	17α-etinylestradiol	57-63-6	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	steroid	liek, veterinárne činidlo
7	mezo-hexestrol	84-16-2	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	uhľovodík (cyklický), fenol	liek, veterinárne činidlo
8	genisteín	446-72-0	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	uhľovodík (heterocyklický), flavonoid	prírodný produkt

▼M8

	Názov látky	Registračné číslo CAS	Očakávaná reakcia	Skúška FW		Skúška CERI		Chemická trieda podľa MESH	Trieda výrobku
				Rozsah koncentrácií (M)	Klasifikácia	Rozsah koncentrácií (M)	Klasifikácia		
9	ekvol	531-95-3	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	metabolit fytoestrogénu	prírodný produkt
10	butylparabén (*n* butyl-4-hydroxybenzoát)	94-26-8	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	parabén	konzervačná látka
11	nonylfenol (zmes)	84852-15-3	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	alkylfenol	medziprodukt
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	organochlórová zlúčenina	insekticíd
13	kortikosterón	50-22-6	*látka nevytvárajúca väzbu (*)*	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	látka nevytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	látka nevytvárajúca väzbu	steroid	prírodný produkt
14	zearalenón	17924-92-4	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	uhľovodík (heterocyklický), laktón	prírodný produkt
15	tamoxifén	10540-29-1	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	uhľovodík (cyklický)	liek, veterinárne činidlo
16	5α-dihydrotestosterón	521-18-6	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	steroid, nefenolový	prírodný produkt
17	bisfenol A	80-05-7	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	fenol	chemický medziprodukt
18	4-*n*-heptylfenol	1987-50-4	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	nejednoznačné ([a])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	alkylfenol	medziprodukt

▼M8

	Názov látky	Registračné číslo CAS	Očakávaná reakcia	Skúška FW		Skúška CERI		Chemická trieda podľa MESH	Trieda výrobku
				Rozsah koncentrácií (M)	Klasifikácia	Rozsah koncentrácií (M)	Klasifikácia		
19	kepon (chlórdekón)	143-50-0	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	uhľovodík (halogénovaný)	pesticíd
20	benz(a)antracén	56-55-3	*látka nevytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka nevytvárajúca väzbu ([b])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka nevytvárajúca väzbu ([b])	aromatický uhľovodík	medziprodukt
21	enterolaktón	78473-71-9	*látka vytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka vytvárajúca väzbu	fytoestrogén	prírodný produkt
22	progesterón	57-83-0	*látka nevytvárajúca väzbu (*)*	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	látka nevytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	látka nevytvárajúca väzbu	steroid	prírodný produkt
23	oktyltrietoxysilán	2943-75-1	*látka nevytvárajúca väzbu*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka nevytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	látka nevytvárajúca väzbu	silán	látka na povrchovú úpravu
24	atrazín	1912-24-9	*látka nevytvárajúca väzbu (*)*	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	látka nevytvárajúca väzbu	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	látka nevytvárajúca väzbu	heterocyklická zlúčenina	herbicíd

(*) Limit rozpustnosti < 1×10^{-4} M.

(**) Použitie a klasifikácia di-n-butyl ftalátu (DBP) ako látky nevytvárajúcej väzbu vychádza z testovania do 10^{-4} M, pretože na základe pozorovania počas predvalidačných štúdií sa v niektorých laboratóriách zistilo, že táto látka je nerozpustná pri 10^{-3} M (napr. zakalenie).

(+) Počas validačnej štúdie sa di-*n*-butyl ftalát (DBP) testoval ako kódovaná testovaná látka pri koncentráciách do 10^{-3} M. Pri týchto podmienkach sa v niektorých laboratóriách pozoroval pokles viazania rádioaktívneho ligandu pri najvyššej koncentrácii (10^{-3} M) a/alebo nejednoznačný priebeh zostrojenej krivky. V prípade týchto testovacích cyklov sa DBP klasifikoval ako „nejednoznačný“ alebo ako „látka vytvárajúca väzbu“ v 3 z 5 laboratórií, ktoré používali skúšku CERI, a v 5 zo 6 laboratórií, ktoré používali skúšku FW [pozri odkaz (2), časti IV.B.3a,b a VI.A].

([a]) Klasifikácia nebola v súlade s očakávanou klasifikáciou. Klasifikácia 4-*n*-heptylfenolu ako „nejednoznačného“ alebo ako „látky nevytvárajúcej väzbu“ v 3 z 5 laboratórií viedla k priemernej klasifikácii s nejednoznačným výsledkom. Pri podrobnejšom skúmaní sa preukázalo, že to bolo spôsobené obmedzeniami chemickej rozpustnosti, ktoré znemožňovali vytvorenie úplnej väzbovej krivky.

([b]) Počas validačnej štúdie došlo k zmene klasifikácie benz(a)antracénu na látku nevytvárajúcu väzbu (t. j. negatívnu) na základe publikovanej literatúry, keď sa preukázalo, že estrogénové pôsobenie *in vitro* uvádzané pre túto látku (16) primárne závisí od jej metabolickej aktivácie (17)(18). Enzymatická metabolická aktivácia látky by sa nepredpokladala v bezbunkových skúškach väzby na hrER, aké sa používali v tejto medzilaboratórnej validačnej štúdii. Táto látka je preto správne klasifikovaná ako „látka nevytvárajúca väzbu“ pri použití v experimentálnych podmienkach pre skúšky FW a CERI.

▼M8

ZLOŽKY SKÚŠKY VÄZBY NA hrER

Základné zložky skúšky

14. Táto testovacia metóda sa týka skúšok využívajúcich receptor ER a vhodne silný ligand k tomuto receptoru, ktorý možno použiť ako marker/značkovaciu látku pre túto skúšku a pri ktorom môže dochádzať k premiestneniu zvyšujúcimi sa koncentráciami testovanej chemikálie. Skúšky väzby sa skladajú z týchto hlavných zložiek: 1. saturačná väzba a 2. kompetitívna väzba. Skúška saturačnej väzby slúži na potvrdenie špecifickosti a pôsobenia prípravkov s receptorom, zatiaľ čo pokus s kompetitívnou väzbou slúži na vyhodnotenie schopnosti testovanej chemikálie viazať sa na hrER.

Kontroly

15. Je potrebné opísať základ navrhovaného súbežného referenčného estrogénu a kontrol. Súbežné kontroly [rozpúšťadlo (nosič), pozitívne (látka vytvárajúca väzbu na ER; silná a slabá afinita), negatívne (látka nevytvárajúca väzbu na ER)] podľa potreby slúžia ako ukazovateľ toho, že skúška je funkčná za podmienok testovania, a poskytujú základ pre porovnania medzi jednotlivými pokusmi. Obvykle sú súčasťou kritérií prijateľnosti pre daný pokus (1). Úplné krivky koncentrácie pre referenčný estrogén a kontroly (t. j. látka vytvárajúca slabú väzbu a látka nevytvárajúca väzbu) sa majú používať na jednej mikrotitračnej platničke pri každom testovacom cykle. Všetky ostatné mikrotitračné platničky majú obsahovať: 1. vysokú (približne úplné premiestnenie ligandu označeného rádioizotopom) a strednú (približne na úrovni IC_{50}) koncentráciu E2 a látky vytvárajúcej slabú väzbu, a to každú z nich trojmo; 2. kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla a nešpecifickú väzbu, každú z nich trojmo.

Štandardné postupy kontroly kvality

16. Štandardné postupy kontroly kvality sa majú vykonať podľa príslušných pokynov pre každú skúšku, aby sa zabezpečilo, že aktívne receptory, správne chemické koncentrácie a tolerančné hranice zostanú počas viacerých replikácií stabilné a schopné poskytovať v priebehu času očakávané reakcie z hľadiska väzby na ER.

Preukázanie spôsobilosti laboratória

17. Pred testovaním neznámych chemikálií pomocou ktorejkoľvek skúšky v rámci tejto testovacej metódy by každé laboratórium malo preukázať spôsobilosť na používanie skúšky, a to uskutočnením saturačných skúšok na potvrdenie špecifickosti a pôsobenia prípravku ER a skúšok kompetitívnej väzby s referenčným estrogénom a kontrolami (látka vytvárajúca slabú väzbu a látka nevytvárajúca väzbu). Laboratórium má vytvoriť historickú databázu s výsledkami pre referenčný estrogén a kontroly, ktoré sa získajú z 3 – 5 nezávislých pokusov uskutočnených v rôznych dňoch. Tieto pokusy budú predstavovať základ pre referenčný estrogén a historické kontroly príslušného laboratória a použijú sa na čiastočné posúdenie prijateľnosti skúšky pri budúcich testovacích cykloch.

18. Vnímavosť testovacieho systému sa overí aj na základe testovania látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v tabuľke 2. Zoznam látok na preukázanie spôsobilosti je podsúborom referenčných látok uvedených vo výkonnostných normách pre skúšky väzby na ER (3). Tieto látky sú komerčne dostupné, predstavujú triedy chemikálií bežne spojené s vytváraním väzieb na estrogénové receptory, majú vhodný rozsah potencie očakávanej pri látkach vytvárajúcich väzbu na estrogénové receptory (t. j. od silnej po slabú potenciu) a pri látkach nevytvárajúcich väzbu (t. j. negatívnych látkach). Pri každej látke na preukázanie spôsobilosti majú testované koncentrácie zahŕňať rozsah uvedený v tabuľke 2. Pre každú látku sa uskutočnia najmenej tri pokusy, pričom výsledky majú byť v súlade s očakávaným chemickým pôsobením. Jednotlivé pokusy sa uskutočňujú nezávisle (t. j. s čerstvo pripravenými riedeniami receptora, chemikálií a reagentu), pričom pre každú koncentráciu sa použijú tri replikáty. Spôsobilosť sa preukazuje správnou klasifikáciou (pozitívna/negatívna) každej látky na preukázanie spôsobilosti. Testovanie spôsobilosti by mal uskutočniť každý laboratórny technik pri učení sa skúšok.

▼M8

Tabuľka 2

Zoznam kontrol a látok na preukázanie spôsobilosti pre skúšky kompetitívnej väzby na hrER ([1])

Č.	Názov látky	Registračné číslo CAS ([2])	Očakávaná reakcia ([3]) ([4])	Rozsah testovaných koncentrácií (M)	Chemická trieda podľa MeSH ([5])	Trieda výrobku ([6])
Kontroly (referenčný estrogén, látka vytvárajúca slabú väzbu, látka nevytvárajúca väzbu)						
1	17-εστραδιολ	50-28-2	látka vytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	steroid	liek, veterinárne činidlo
2	noretynodrel (alebo) noretindrón	68-23-5 (alebo) 68-22-4	látka vytvárajúca väzbu	$3 \times 10^{-9} – 30 \times 10^{-6}$	steroid	liek, veterinárne činidlo
3	oktyltrietoxysilán	2943-75-1	látka nevytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	silán	látka na povrchovú úpravu
Látky na preukázanie spôsobilosti ([6])						
4	dietylstilbestrol	56-53-1	látka vytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	uhľovodík (cyklický), fenol	liek, veterinárne činidlo
5	17α-etinylestradiol	57-63-6	látka vytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	steroid	liek, veterinárne činidlo
6	mezo-hexestrol	84-16-2	látka vytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	uhľovodík (cyklický), fenol	liek, veterinárne činidlo
7	tamoxifén	10540-29-1	látka vytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	uhľovodík (cyklický)	liek, veterinárne činidlo
8	genisteín	446-72-0	látka vytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	heterocyklická zlúčenina, flavonoid	prírodný produkt
9	bisfenol A	80-05-7	látka vytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	fenol	chemický medziprodukt
10	zearalenón	17924-92-4	látka vytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-3}$	heterocyklická zlúčenina, laktón	prírodný produkt

▼M8

Č.	Názov látky	Registračné číslo CAS ([2])	Očakávaná reakcia ([3]) ([4])	Rozsah testovaných koncentrácií (M)	Chemická trieda podľa MeSH ([5])	Trieda výrobku ([6])
11	butylparabén	94-26-8	látka vytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	karboxylová kyselina, fenol	konzervačná látka
12	atrazín	1912-24-9	látka nevytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	heterocyklická zlúčenina	herbicíd
13	di-n-butyl ftalát (DBP) ([7])	84-74-2	látka nevytvárajúca väzbu ([8])	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	uhľovodík (cyklický), ester	zmäkčovadlo, chemický medziprodukt
14	kortikosterón	50-22-6	látka nevytvárajúca väzbu	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$	steroid	prírodný produkt

([1]) Ak látka na preukázanie spôsobilosti už nie je komerčne dostupná, možno použiť látku s rovnakou klasifikáciou z hľadiska väzby na ER, porovnateľnou potenciou a chemickou triedou.
([2]) Skratky: Registračné číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service).
([3]) Klasifikácia látok ako látok vytvárajúcich alebo nevytvárajúcich väzbu na ERα počas validačnej štúdie pri skúškach FW a CERI väzby na hrER (2).
([4]) Určenie vytvárania väzby na ER vychádzalo z podkladových kontrolných dokumentov (Background Review Document – BRD) výboru ICCVAM pre skúšky väzby na estrogénové receptory a skúšky transaktivácie (TA) (9), ako aj z empirických údajov a ďalších informácií získaných z referenčných štúdií, ktoré boli publikované a revidované (10) (11) (12) (13) (14) (15).
([5]) Látky boli zaradené do jednej alebo viacerých chemických tried podľa systému Medical Subject Headings (MeSH) inštitútu U. S. National Library of Medicine, čo je medzinárodne uznávaný štandardizovaný klasifikačný systém (k dispozícii na adrese: http://www.nlm.nih.gov/mesh).
([6]) Látky boli zaradené do jednej alebo viacerých tried výrobku podľa databázy nebezpečných látok inštitútu U.S. National Library of Medicine (k dispozícii na adrese: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).
([7]) DBP možno použiť ako alternatívnu kontrolnú látku nevytvárajúcu väzbu, testovanú pri maximálnej koncentrácii 10^{-4} M.
([8]) Limit rozpustnosti tejto látky je 10^{-4} M. Použitie a klasifikácia di-n-butyl-ftalátu (DBP) ako látky nevytvárajúcej väzbu vychádza z testovania do 10^{-4} M, pretože na základe pozorovania počas predvalidačných štúdií sa v niektorých laboratóriách zistilo, že táto látka je nerozpustná pri 10^{-3} M (napr. zakalenie).

▼M8

Testovanie rozpustnosti a zisťovanie rozsahu koncentrácií testovaných chemikálií

19. Je potrebné vykonať predbežný test s cieľom určiť limit rozpustnosti pre jednotlivé testované chemikálie a stanoviť vhodný rozsah koncentrácií, ktorý sa má používať pri vykonávaní testu. Limit rozpustnosti pre jednotlivé testované chemikálie sa určí najskôr v rozpúšťadle a následne sa potvrdí v podmienkach skúšky. Konečná koncentrácia testovaná v rámci skúšky nemá prekročiť 1 mM. Súčasťou testovania na zistenie rozsahu je kontrola s aplikáciou rozpúšťadla spolu s ôsmimi logaritmickými sériovými riedeniami, pričom sa začína pri maximálnej prijateľnej koncentrácii (napr. 1 mM alebo nižšej podľa limitu rozpustnosti) a zaznamená sa prítomnosť zakalenia alebo zrazeniny. Koncentrácie v druhom a treťom pokuse sa príslušne upravia, aby sa dosiahlo lepšie charakterizovanie krivky závislosti reakcie od koncentrácie.

Kritériá prijateľnosti testovacích cyklov

20. Prijatie alebo zamietnutie testovacieho cyklu je založené na hodnotení výsledkov získaných pri referenčnom estrogéne a kontrole, ktoré sa použili pri jednotlivých pokusoch. Po prvé, na mikrotitračnej platničke 1 majú úplné krivky koncentrácie pre referenčné kontroly z jednotlivých pokusov spĺňať miery výkonnosti s parametrami zostrojenia krivky [napr. IC_{50} a sklon krivky podľa Hillovej rovnice (Hillslope)] na základe výsledkov uvádzaných pre príslušné protokoly skúšok CERI a FW (dodatok 2 a 3) a údajov o historických kontrolách z laboratória, ktoré vykonáva test. Všetky kontroly (referenčný estrogén, látka vytvárajúca slabú väzbu a látka nevytvárajúca väzbu) sa majú pri každom pokuse správne klasifikovať. Po druhé, je potrebné posúdiť kontroly na ďalších mikrotitračných platničkách z hľadiska konzistentnosti s mikrotitračnou platničkou 1. Je potrebné použiť dostatočný rozsah koncentrácií testovanej chemikálie, aby bolo možné jednoznačne určiť vrchol krivky kompetitívnej väzby. Variabilita medzi replikátmi pri jednotlivých koncentráciách testovanej chemikálie, ako aj medzi tromi nezávislými testovacími cyklami má byť primeraná a vedecky odôvodniteľná. Schopnosť konzistentne vykonávať skúšku by sa mala preukázať vytvorením a udržiavaním historickej databázy referenčného estrogénu a kontrol. Na meranie vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti možno použiť štandardné odchýlky (SD) alebo variačné koeficienty (CV) pre stredné hodnoty parametrov na zostrojenie krivky referenčného estrogénu a kontrolnej látky vytvárajúcej slabú väzbu z viacerých pokusov. Pri posudzovaní výsledkov kontrol na mikrotitračnej platničke pri jednotlivých testovacích cykloch, ako aj pri jednotlivých testovaných chemikáliách je potrebné postupovať na základe odborného úsudku.

Okrem toho by mali byť splnené tieto zásady týkajúce sa kritérií prijateľnosti:

— údaje majú byť dostatočné na kvantitatívne posúdenie väzby na ER,

— testované koncentrácie majú zostať v rozsahu rozpustnosti testovanej chemikálie.

Analýza údajov

21. Stanovený postup analýzy údajov v prípade údajov o saturačnej a kompetitívnej väzbe má byť v súlade s hlavnými zásadami na charakterizovanie interakcií medzi ligandom a receptorom. Údaje týkajúce sa saturačnej väzby sa zvyčajne analyzujú pomocou modelu nelineárnej regresie, ktorý zahŕňa celkovú aj nešpecifickú väzbu. Pri určovaní hodnôt B_{max} a K_d môže byť potrebná korekcia pre prípad zníženia počtu ligandov [napr. Swillens, 1995 (19)]. Údaje zo skúšok kompetitívnej väzby sa zvyčajne transformujú [napr. percentuálna hodnota špecifickej väzby a koncentrácia testovanej chemikálie (logM)]. Odhady $log(IC_{50})$ pre každú testovanú

▼M8

chemikáliu sa určia pomocou vhodného softvéru na zostrojenie krivky nelineárnej funkcie v súlade s Hillovou rovnicou so štyrmi parametrami. Po počiatočnej analýze sa uskutoční stanovenie parametrov zostrojenia krivky a vizuálna kontrola toho, nakoľko údaje o väzbe zodpovedajú vygenerovanej krivke kompetitívnej väzby. V niektorých prípadoch môže byť potrebná dodatočná analýza na optimálne zostrojenie krivky [napr. obmedzenie vrchnej a/alebo spodnej časti krivky, použitie pravidla 10 %, pozri dodatok 4 a odkaz 2 (časť III.A.2)].

22. Splnenie kritérií prijateľnosti (odsek 20) naznačuje, že skúšobný systém funguje správne, nie je však zabezpečené, že z ktoréhokoľvek konkrétneho testu vyplynú presné údaje. Zopakovanie správnych výsledkov prvého testu je najlepší ukazovateľ toho, že boli generované presné údaje.

Všeobecné kritériá interpretácie údajov

23. V súčasnosti neexistuje všeobecne dohodnutá metóda na interpretáciu údajov o väzbe na ER. Oba typy posudzovania pôsobenia, ktoré sprostredkúva hrER, t. j. kvalitatívne hodnotenie (napr. či látka vytvára/nevytvára väzbu) aj kvantitatívne hodnotenie [napr. hodnota $\log IC_{50}$, relatívna afinita (RBA)], by však mali byť založené na empirických údajoch a spoľahlivom vedeckom úsudku.

Správa o teste

24. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Skúška:

— použitá skúška.

Kontrolná/referenčná/testovaná chemikália:

— zdroj, číslo šarže, konečný dátum použitia, ak sú tieto informácie k dispozícii,

— stabilita testovanej chemikálie, ak je známa,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle, ak je známa,

— prípadné meranie pH, osmolality a zrazeniny v kultivačnom médiu, do ktorého bola pridaná testovaná chemikália.

Jednozložkové látky:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

▼**M8**

Rozpúšťadlo/nosič:

— charakterizácia (povaha, dodávateľ a šarža),

— zdôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča,

— rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Receptory:

— zdroj receptorov (dodávateľ, katalógové číslo, šarža, druh receptora, aktívna koncentrácia receptora uvedená dodávateľom, certifikácia od dodávateľa),

— charakterizácia receptorov (vrátane výsledkov saturačnej väzby): K_d, B_{max},

— skladovanie receptorov,

— ligand označený rádioizotopom:

— dodávateľ, katalógové číslo, šarža, špecifická aktivita.

Podmienky testovania:

— obmedzenia rozpustnosti v podmienkach skúšky,

— zloženie tlmivého roztoku na stanovenie väzby,

— koncentrácia receptora,

— koncentrácia značkovacej látky (t. j. ligandu označeného rádioizotopom),

— koncentrácie testovanej chemikálie,

— percentuálny podiel nosiča v konečnej skúške,

— inkubačná teplota a čas,

— metóda oddelenia viazaných/voľných zložiek,

— pozitívne a negatívne kontroly/referenčné látky,

— kritériá, podľa ktorých sa testy považujú za pozitívne, negatívne alebo nejednoznačné.

Kontrola prijateľnosti:

— skutočné hodnoty IC_{50} a sklonu krivky podľa Hillovej rovnice (Hillslope) pre súbežné pozitívne kontroly/referenčné látky.

Výsledky:

— nespracované údaje a údaje o viazaných/voľných zložkách,

— kontrola na potvrdenie denaturácie, ak je to vhodné,

— najnižšia účinná koncentrácia (LEC), ak existuje,

— hodnoty RBA a/alebo IC_{50}, ak je to vhodné,

— vzťah medzi koncentráciou a reakciou, ak ho možno určiť,

— štatistické analýzy, ak existujú, spolu s meraním chyby a spoľahlivosti (napr. SEM, SD, CV alebo 95 % CI) a opis spôsobu získania týchto hodnôt.

▼**M8**

Diskusia o výsledkoch:

— uplatňovanie pravidla 10 %

Záver

LITERATÚRA

(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: s. 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): s. 1073-89.

(7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol*. Lab. Med., 135(1): s. 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. s. 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**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV A SKRATKY

Pravidlo 10 %: možnosť vylúčiť z analýzy údajové body, pri ktorých stredná hodnota replikátov v prípade percentuálnej hranice špecifickej pre [^{3}H]17β-estradiol najmenej o 10 % presahuje úroveň pozorovanú v prípade strednej hodnoty pri nižšej koncentrácii (pozri dodatok 4).

Kritériá prijateľnosti: minimálne normy výkonnosti kontrol a referenčných štandardov v rámci pokusu. Všetky kritériá prijateľnosti majú byť splnené, aby sa pokus považoval za platný.

Presnosť (zhoda): miera zhody výsledkov skúšky s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o mieru výkonnosti skúšky a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom zhoda a označuje podiel správnych výsledkov skúšky (1).

CF: koncepčný rámec OECD na testovanie a hodnotenie endokrinných disruptorov.

Chemikália: látka alebo zmes.

CV: variačný koeficient

E2: 17β-estradiol

ED: narušenie endokrinného systému

hERα: ľudský estrogénový receptor alfa

ER: estrogénový receptor

Estrogénové pôsobenie: schopnosť chemikálie napodobniť 17β-estradiol v jeho schopnosti viazať estrogénové receptory. Vytvorenie väzby na hERα možno zistiť pomocou tejto testovacej metódy.

IC_{50}: polovičná maximálna účinná koncentrácia inhibičnej testovanej chemikálie.

ICCVAM: Medziagentúrny koordinačný výbor pre validáciu alternatívnych metód (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods).

Medzilaboratórna reprodukovateľnosť': miera, do akej rôzne kvalifikované laboratóriá, ktoré používajú rovnaký protokol a testujú rovnaké látky, dokážu dosiahnuť kvalitatívne a kvantitatívne podobné výsledky. Medzilaboratórna reprodukovateľnosť sa určuje počas postupov predvalidácie a validácie a udáva sa ňou rozsah, v akom možno skúšku úspešne preniesť medzi laboratóriami. Označuje sa aj ako reprodukovateľnosť medzi laboratóriami (1).

Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť': určenie miery, do akej kvalifikovaní pracovníci v rámci jedného laboratória dokážu úspešne opakovať výsledky s použitím konkrétneho protokolu v rôznom čase. Takisto sa označuje ako reprodukovateľnosť v rámci laboratória (1).

LEC: najnižšia účinná koncentrácia – je to najnižšia koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá vyvoláva reakciu (t. j. najnižšia koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej je násobná indukcia štatisticky odlišná od súbežnej kontroly s nosičom).

▼M8

Test Me-too: hovorový názov skúšky, ktorá je štrukturálne a funkčne podobná validovanej a akceptovanej referenčnej testovacej metóde. Môže sa používať namiesto výrazu podobná testovacia metóda.

PBTG: usmernenie na vykonávanie testov výkonnosti.

Výkonnostné normy: normy založené na validovanej testovacej metóde, ktoré slúžia ako základ na hodnotenie porovnateľnosti navrhovanej skúšky, ktorá je mechanicky a funkčne podobná. Patria sem: 1. nevyhnutné zložky skúšky; 2. minimálny zoznam referenčných chemikálií vybraných spomedzi látok používaných na preukázanie prijateľnej výkonnosti validovanej testovacej metódy a 3. porovnateľné úrovne presnosti a spoľahlivosti založené na tom, čo sa získalo pri validovanej testovacej metóde, ktoré by navrhovaná skúška mala preukázať pri hodnotení pomocou minimálneho zoznamu referenčných chemikálií (1).

Látky na preukázanie spôsobilosti: podskupina referenčných látok zahrnutých do výkonnostných noriem, ktorú môžu laboratóriá použiť na preukázanie technickej spôsobilosti na vykonávanie štandardizovanej skúšky. Kritériá výberu pre tieto látky zvyčajne zahŕňajú podmienku, že látky predstavujú daný rozsah reakcií, sú komerčne dostupné a sú o nich k dispozícii referenčné údaje vysokej kvality.

Spôsobilosť: preukázaná schopnosť správne vykonať skúšku pred testovaním neznámych látok.

Referenčný estrogén: 17ß-estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referenčné testovacie metódy: skúšky, o ktoré sa PBTG 493 opiera.

RBA: relatívna afinita. RBA látky sa vypočíta ako percentuálny podiel hodnoty log(IC_{50}) príslušnej látky vzhľadom na hodnotu log(IC_{50}) pre 17β-estradiol.

Relevantnosť: opis vzťahu skúšky k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej sa skúškou správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) skúšky (1).

Spoľahlivosť: miera rozsahu, v rámci ktorého sa môže skúška počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti.

SD: štandardná odchýlka.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Validovaná testovacia metóda: skúška, v súvislosti s ktorou sa ukončili validačné štúdie na stanovenie relevantnosti (vrátane presnosti) a spoľahlivosti na konkrétny účel. Je dôležité poznamenať, že validovaná testovacia metóda nemusí mať dostatočnú výkonnosť, pokiaľ ide o presnosť a spoľahlivosť, aby bola prijateľná pre navrhovaný účel (1).

Validácia: proces, ktorým sa stanovuje spoľahlivosť a relevantnosť určitého prístupu, metódy, skúšky, postupu alebo posúdenia na vymedzený účel (1).

▼**M8**

Dodatok 2

FREYBERGEROVE-WILSONOVE SKÚŠKY IN VITRO SATURAČNEJ A KOMPETITÍVNEJ VÄZBY NA ESTROGÉNOVÝ RECEPTOR (ERα) S VYUŽITÍM ÚPLNÉHO REKOMBINANTNÉHO ERα

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA (POZRI AJ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Pri tejto skúške *in vitro* saturačnej a kompetitívnej väzby na estrogénový receptor (ERα) sa využíva úplný ľudský receptor ERα (hrERα), ktorý sa vytvára v bunkách hmyzu infikovaných bakulovírusom, z ktorých sa izoluje. Protokol, ktorý vytvorili Freyberger a Wilson, sa posudzoval v rámci medzinárodnej medzilaboratórnej validačnej štúdie (2), ktorou sa preukázala jeho relevantnosť a spoľahlivosť na zamýšľaný účel tejto skúšky.

2. Táto skúška predstavuje skríningový postup na identifikovanie látok, ktoré sa dokážu viazať na úplný ľudský estrogénový receptor hrERα. Slúži na stanovenie schopnosti testovanej chemikálie konkurovať 17β-estradiolu pri viazaní sa na hrERα. Súčasťou kvantitatívnych výsledkov skúšky môže byť hodnota IC_{50} (miera koncentrácie testovanej chemikálie, ktorá je potrebná na premiestnenie polovice [^{3}H]-17β-estradiolu z hrERα) a relatívne afinity testovaných chemikálií k hrERα v porovnaní so 17β-estradiolom. Na účely skríningu chemikálií môžu prijateľné kvalitatívne výsledky skúšky zahŕňať klasifikáciu testovaných chemikálií ako látok vytvárajúcich väzbu na hrERα, látok nevytvárajúcich väzbu alebo nejednoznačných látok na základe kritérií opísaných pre väzbové krivky.

3. Pri skúške sa používa ligand označený rádioizotopom, laboratórium preto musí mať povolenie na prácu s rádioaktívnymi materiálmi. Pri všetkých postupoch s rádioizotopmi a nebezpečnými chemikáliami je potrebné dodržiavať nariadenia a postupy opísané vo vnútroštátnych právnych predpisoch.

4. Pred použitím tejto skúšky na regulačné účely je potrebné prečítať si časti **VŠEOBECNÝ ÚVOD** a **ZLOŽKY SKÚŠKY VÄZBY NA hrER**. Vymedzenie pojmov a skratky použité v tomto usmernení na vykonávanie testov sú uvedené v dodatku 1.

PRINCÍPY SKÚŠKY (POZRI AJ ČASŤ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

5. V rámci skúšky väzby na hrERα sa meria schopnosť ligandu označeného rádioizotopom ([^{3}H]17β-estradiol) viazať sa na ER v prítomnosti zvyšujúcich sa koncentrácií testovanej chemikálie (t. j. konkurenta). Testované chemikálie, ktoré sa vyznačujú vysokou afinitou k ER, si konkurujú s ligandom označeným rádioizotopom pri nižšej koncentrácii v porovnaní s chemikáliami, ktorých afinita k receptoru je nižšia.

6. Táto skúška obsahuje dve hlavné zložky: pokus na základe saturačnej väzby, ktorým sa charakterizujú parametre interakcie medzi receptorom a ligandom, po ktorom nasleduje pokus na základe kompetitívnej väzby, ktorým sa charakterizuje vzájomné konkurovanie si testovanej chemikálie a ligandu označeného rádioizotopom pri snahe o naviazanie sa na ER.

7. Účelom pokusu na základe saturačnej väzby je charakterizovať konkrétnu šaržu receptorov z hľadiska afinity a počtu v prípravku pre pokus na základe kompetitívnej väzby. Pri pokuse na základe saturačnej väzby sa v rovnovážnych podmienkach meria afinita pevne stanovenej koncentrácie estrogénového receptora k svojmu prirodzenému ligandu (vyjadruje ju disociačná konštanta, K_d) a koncentrácia aktívnych miest receptora (B_{max}).

▼M8

8. Pri pokuse na základe kompetitívnej väzby sa meria afinita látky z hľadiska konkurovania si s [^{3}H]17β-estradiolom pri viazaní sa na ER. Afinita sa kvantifikuje na základe koncentrácie testovanej chemikálie, pri ktorej v rovnovážnom stave dochádza k inhibícii 50 % špecifickej väzby [^{3}H]17β-estradiolu (označuje sa ako „inhibičná koncentrácia 50 %“ alebo IC_{50}). Vyhodnotenie je možné aj pomocou relatívnej afinity (RBA, vzhľadom na hodnotu IC_{50} estradiolu pri samostatnom meraní v tom istom testovacom cykle). Pri pokuse na základe kompetitívnej väzby sa meria viazanie sa [^{3}H]17β-estradiolu v pevnej stanovenej koncentrácii v prítomnosti širokého rozsahu (osem rádov) koncentrácií testovanej chemikálie. Tieto údaje sa potom prispôsobia, ak je to možné, podobe Hillovej rovnice (Hill, 1910), ktorou sa opisuje premiestnenie rádioaktívneho ligandu látkou vytvárajúcou väzbu, ktorá mu konkuruje na jednom mieste. Rozsah premiestnenia estradiolu označeného rádioizotopom v rovnovážnom stave slúži na charakterizovanie testovanej chemikálie ako látky vytvárajúcej väzbu, nevytvárajúcej väzbu alebo spôsobujúcej nejednoznačnú reakciu.

POSTUP

Preukázanie prijateľnej výkonnosti bielkoviny hrERα

9. Pred bežným vykonávaním skúšok saturačnej a kompetitívnej väzby je potrebné preukázať správnu výkonnosť každej novej šarže hrERα v laboratóriu, v ktorom sa bude používať. Na preukázanie výkonnosti sa použije dvojstupňový postup. Skladá sa z týchto krokov:

— Uskutoční sa skúška saturačnej väzby [^{3}H]-17β-estradiolu s cieľom preukázať špecifickosť a saturáciu hrERα. Na základe nelineárnej regresnej analýzy týchto údajov (napr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) a následného Scatchardovho znázornenia sa zdokumentuje afinita [^{3}H]-17β-estradiolu (K_d) a počet receptorov (B_{max}) pre každú šaržu hrERα.

— Uskutoční sa skúška kompetitívnej väzby pomocou kontrolných látok [referenčný estrogén (17β-estradiol)], látka vytvárajúca slabú väzbu (napr. noretynodrel alebo noretindrón) a látka nevytvárajúca väzbu (oktyltrietoxysilán, OTES). Každé laboratórium si vytvorí historickú databázu na zdokumentovanie konzistentnosti hodnoty IC_{50} a iných relevantných hodnôt pre referenčný estrogén a látku vytvárajúcu slabú väzbu medzi pokusmi a rôznymi šaržami hrERα. Parametre kriviek kompetitívnej väzby pre kontrolné látky majú byť v rámci hraníc 95 % intervalu spoľahlivosti (pozri tabuľku 1), ktoré sa vytvorili na základe údajov z laboratórií zapojených do validačnej štúdie tejto skúšky (2).

Tabuľka 1

Kritériá výkonnosti vytvorené pre referenčný estrogén a látku vytvárajúcu slabú väzbu, skúška FW väzby na hrER

Látka	Parameter	Stredná hodnota [a]	Štandardná odchýlka (n)	95 % intervaly spoľahlivosti [b]	
				Dolná hranica	Horná hranica
17β-estradiol	Horný bod (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Dolný bod (%)	0,29	1,25 (67)	–0,01	0,60
	Sklon krivky podľa Hillovej rovnice (Hill-slope)	–1,06	0,20 (67)	–1,11	–1,02
	$LogIC_{50}$ (M)	–8,92 ()	0,18 (67)	–8,97	–8,88

▼M8

Látka	Parameter	Stredná hodnota ([a])	Štandardná odchýlka (n)	95 % intervaly spoľahlivosti ([b])	
				Dolná hranica	Horná hranica
Noretynodrel	Horný bod (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Dolný bod (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Sklon krivky podľa Hillovej rovnice (Hill-slope)	–1,01	0,38 (68)	–1,10	–0,92
	$LogIC_{50}$ (M)	–6,39	0,27 (68)	–6,46	–6,33
Noretindrón ([c])	Horný bod (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Dolný bod (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Sklon krivky podľa Hillovej rovnice (Hill-slope)	–1,41	0,32 (27)	–1,53	–1,28
	$LogIC_{50}$ (M)	–5,73	0,27 (27)	–5,84	–5,62

([a]) Stredná hodnota (n) ± štandardná odchýlka (SD) sa vypočítali pomocou odhadov parametrov zostrojenia krivky (Hillova rovnica so 4 parametrami) pre kontrolné testovacie cykly uskutočnené v štyroch laboratóriách počas validačnej štúdie (pozri prílohu N v odkaze 2).

([b]) 95 % intervaly spoľahlivosti sa uvádzajú ako usmernenie pre kritériá prijateľnosti.

([c]) V rámci čiastkovej úlohy 4 počas validačnej štúdie bolo testovanie noretindrónu voliteľné (pozri odkaz 2, pozri čiastkovú úlohu 4). Stredné hodnoty ± SD (n) sa tak vypočítali pomocou odhadov zostrojenia krivky (Hillova rovnica so 4 parametrami) pre kontrolné testovacie cykly uskutočnené v dvoch laboratóriách.
Rozsah IC_{50} *bude závisieť od hodnoty* K_d *prípravku s receptorom a od koncentrácie ligandu označeného rádioizotopom, ktorá sa používala v jednotlivých laboratóriách. Prijateľná bude vhodná úprava z hľadiska rozsahu* IC_{50} *na základe podmienok použitých pri uskutočnení štúdie.*

Preukázanie spôsobilosti laboratória

10. Pozri odseky 17 a 18 a tabuľku 2 v časti **ZLOŽKY SKÚŠKY VÄZBY NA hrER** tejto testovacej metódy. Každá skúška (pre saturačnú a kompetitívnu väzbu) sa skladá z troch nezávislých testovacích cyklov (t. j. s čerstvo pripravenými riedeniami receptora, chemikálií a reagentu) uskutočnených v rôznych dňoch, pričom každý testovací cyklus obsahuje tri replikáty.

Stanovenie koncentrácie receptora (hrERα)

11. Koncentrácia aktívneho receptora sa mierne líši v závislosti od šarže a podmienok skladovania. Je preto potrebné stanoviť koncentráciu aktívneho receptora pri jeho prijatí od dodávateľa. Zistí sa tak vhodná koncentrácia aktívneho receptora v čase testovacieho cyklu.

12. V podmienkach zodpovedajúcich kompetitívnej väzbe (t. j. [^{3}H]-estradiol s koncentráciou 1 nM) sa nominálne koncentrácie 0,25, 0,5, 0,75 a 1 nM receptora inkubujú bez prítomnosti (celková väzba) a v prítomnosti (nešpecifická väzba) neoznačeného estradiolu s koncentráciou 1 μM. Špecifická väzba vypočítaná ako rozdiel celkovej a nešpecifickej väzby sa znázorní v závislosti od nominálnej koncentrácie receptora. Koncentrácia receptora, ktorá poskytuje hodnoty špecifickej väzby zodpovedajúce 20 % pridaného rádioaktívneho indikátora, súvisí so zodpovedajúcou nominálnou koncentráciou receptora a táto koncentrácia receptora sa má použiť pre pokusy na základe saturačnej a kompetitívnej väzby. Táto podmienka bude často splnená pri konečnej koncentrácii hrER na úrovni 0,5 nM.

▼M8

13. Ak toto 20 % kritérium opakovane nemožno splniť, je potrebné skontrolovať výskyt potenciálnych chýb v pokusnom systéme. Nesplnenie 20 % kritéria môže signalizovať, že sa v rekombinantnej šarži nachádza veľmi malé množstvo aktívneho receptora. V takom prípade je potrebné zvážiť použitie inej šarže receptora.

Saturačná skúška

14. Osem zvyšujúcich sa koncentrácií [^{3}H]17β-estradiolu sa vyhodnocuje trojmo pri týchto troch podmienkach (pozri tabuľku 2):

— bez prítomnosti neoznačeného 17β-estradiolu a v prítomnosti ER. Stanovuje sa tak celková väzba meraním rádioaktivity v jamkách, v ktorých sa nachádza len [^{3}H]17β-estradiol,

— v prítomnosti 1000-násobnej nadmernej koncentrácie neoznačeného 17β-estradiolu oproti označenému 17β-estradiolu a v prítomnosti ER. Zámerom tejto podmienky je saturovať aktívne väzbové miesta neoznačeným 17β-estradiolom a určiť nešpecifickú väzbu meraním rádioaktivity v jamkách. Pri všetkom zvyšnom označenom estradiole, ktorý sa môže naviazať na receptor, sa predpokladá, že sa viaže na nešpecifické miesto, keďže neoznačený estradiol má takú vysokú koncentráciu, že sa viaže na všetky dostupné špecifické miesta na receptore,

— bez prítomnosti neoznačeného 17β-estradiolu a bez prítomnosti ER (stanovenie celkovej rádioaktivity).

Príprava roztokov [^{3}H]-17β-estradiolu a neoznačeného 17β-estradiolu

15. Riedenia [^{3}H]-17β-estradiolu sa pripravia pridaním tlmivého skúšobného roztoku do zásobného roztoku [^{3}H]-17β-estradiolu s koncentráciou 12 nM, čím sa dosiahnu koncentrácie v pôvodnom rozsahu od 0,12 nM do 12 nM. Pridaním 40 µl týchto roztokov do príslušných skúšobných jamiek na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke (v konečnom objeme 160 µl) sa získajú konečné skúšobné koncentrácie v rozsahu od 0,03 do 3,0 nM. Príprava tlmivého skúšobného roztoku, zásobného roztoku [^{3}H]-17β-estradiolu a riedení a stanovenie koncentrácií sa podrobne opisujú v protokole skúšky FW (2).

16. Riedenia etanolových roztokov 17β-estradiolu sa pripravia pridaním tlmivého skúšobného roztoku, aby sa dosiahlo osem zvyšujúcich sa koncentrácií v pôvodnom rozsahu od 0,06 µM do 6 µM. Pridaním 80 µl týchto roztokov do príslušných skúšobných jamiek na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke (v konečnom objeme 160 µl) sa získajú konečné skúšobné koncentrácie v rozsahu od 0,03 µM do 3 µM. Konečná koncentrácia neoznačeného 17β-estradiolu v jednotlivých jamkách v rámci skúšky nešpecifickej väzby má byť 1000-násobok koncentrácie označeného [^{3}H]-17β-estradiolu. Príprava riedení neoznačeného 17β-estradiolu sa podrobne opisuje v protokole skúšky FW (2).

17. Použije sa nominálna koncentrácia receptora so špecifickou väzbou na úrovni 20 ±5 % (pozri odseky 12 – 13). Roztok hrERα sa musí pripraviť bezprostredne pred použitím.

18. 96-jamkové mikrotitračné platničky sa pripravia podľa znázornenia v tabuľke 2, pričom na každú koncentráciu sa použijú 3 replikáty. Príklad priradenia koncentrácií a objemov [^{3}H]-17β-estradiolu, neoznačeného 17β-estradiolu, tlmivého roztoku a receptora na mikrotitračnej platničke sa uvádza v dodatku 2.2.

▼**M8**

Tabuľka 2

Rozloženie pri skúške saturačnej väzby na mikrotitračnej platničke

	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			Celková väzba (rozpúšťadlo)
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 E_2			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,10 µM E2			Nešpecifická väzba
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													

[3H] E2: [3H]-17β-estradiol
ER: estrogénový receptor
E2: neoznačený 17β-estradiol

19. Skúšobné mikrotitračné platničky sa inkubujú 16 až 20 hodín pri teplote 2 až 8 °C a počas inkubačného času sú umiestnené v rotátore.

Meranie [3H]-17β-estradiolu viazaného na hrERα

20. [^{3}H]-17β-estradiol viazaný na hrERα sa separuje od voľného [^{3}H]-17β-estradiolu pridaním 80 µl studenej suspenzie DCC do každej jamky, pričom sa mikrotitračné platničky 10 minút pretrepávajú a 10 minút odstreďujú približne pri 2500 ot./min. S cieľom minimalizovať disociáciu naviazaného [^{3}H]-17β-estradiolu od hrERα počas tohto postupu je mimoriadne dôležité, aby mali tlmivé roztoky a skúšobné jamky teplotu 2 až 8 °C a aby sa jednotlivé kroky vykonali rýchlo. Na účinné a rýchle spracovanie mikrotitračných platničiek sa vyžaduje trepačka.

21. 50 µl supernatantu obsahujúceho [^{3}H]-17β-estradiol naviazaný na hrERα sa potom veľmi opatrne odoberie, aby nedošlo ku kontaminácii jamiek dotykom DCC, a umiestni sa na druhú mikrotitračnú platničku.

22. Ďalej sa do každej jamky (A1 – B12 a D1 až E12) pridá 200 µl scintilačnej kvapaliny so schopnosťou premieňať kinetickú energiu nukleárneho žiarenia na svetelnú energiu. Jamky G1 – H12 (označené ako jamky na určenie celkového počtu rozpadov za minútu – dpm) predstavujú sériové riedenia [^{3}H]-17β-estradiolu (40 µl), ktoré sa majú preniesť priamo do scintilačnej kvapaliny v jamkách na meracej mikrotitračnej platničke podľa tabuľky 3, t. j. tieto jamky obsahujú iba 200 µl scintilačnej kvapaliny a vhodné riedenie [3H]-17β-estradiolu. Na základe uvedených mier sa preukazuje množstvo [^{3}H]-17β-estradiolu vyjadrené ako počet rozpadov za minútu, ktoré sa pridalo do každej množiny jamiek na určenie celkovej väzby, resp. nešpecifickej väzby.

▼M8

Tabuľka 3

Rozloženie pri skúške saturačnej väzby na mikrotitračnej platničke, meranie rádioaktivity

	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			Celková väzba (rozpúšťadlo)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [^{3}H] E2+ ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [3H] E2 + ER + 0,10 μM E2			Nešpecifická väzba
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 (celková hodnota dpm)			0,06 nM [^{3}H] E2			0,08 nM [^{3}H] E2			0,10 nM [^{3}H] E2			Celková hodnota 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			

[3H] E2: [3H]-17β-estradiol
ER: estrogénový receptor
E2: neoznačený 17β-estradiol
dpm: počet rozpadov za minútu
(*) Sériové riedenia estradiolu rádioaktívne označeného pomocou [^{3}H] sa tu priamo pridajú do 200 μl scintilačnej kvapaliny v jamkách G1 – H12.

23. Meranie sa začne najmenej po dvojhodinovej prestávke a čas počítania je 40 minút na jamku. Na stanovenie hodnoty dpm/jamka s korekciu strát sa použije scintilačný spektrometer mikrotitračných platničiek. Prípadne možno na meranie vzoriek použiť konvenčný čítač, pokiaľ nie je scintilačný spektrometer k dispozícii. Pri takýchto podmienkach možno zvážiť skrátenie času počítania.

Skúška kompetitívnej väzby

24. Pri skúške kompetitívnej väzby sa meria väzba jednej koncentrácie [^{3}H]-17β-estradiolu v prítomnosti zvyšujúcich sa koncentrácií testovanej chemikálie. V rámci jedného testovacieho cyklu sa pri každej koncentrácii použijú tri súbežné replikáty. Okrem toho sa pri každej testovanej chemikálii uskutočnia tri nesúbežné testovacie cykly. Skúška sa pripraví v jednej alebo vo viacerých 96-jamkových mikrotitračných platničkách.

Kontroly

25. Pri vykonávaní skúšky je súčasťou každého pokusu súbežné rozpúšťadlo a kontroly (t. j. referenčný estrogén, látka vytvárajúca slabú väzbu a látka nevytvárajúca väzbu). Úplné krivky koncentrácie pre referenčný estrogén a kontroly (t. j. látka vytvárajúca slabú väzbu a látka nevytvárajúca väzbu) sa majú používať na jednej mikrotitračnej platničke pri každom testovacom cykle. Všetky ostatné platničky obsahujú i) vysokú (maximálna miera premiestnenia) a strednú (približne na úrovni IC_{50}) koncentráciu E2 a látky vytvárajúcej slabú väzbu, a to každú z nich trojmo; ii) kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla a nešpecifickú väzbu, každú z nich najmenej trojmo. Postupy prípravy tlmivého skúšobného roztoku, kontrol, roztokov [^{3}H]-17β-estradiolu, hrERα a testovanej chemikálie sú opísané v odkaze 2 (príloha K, pozri protokol skúšky FW).

▼**M8**

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla:

26. Pomocou kontroly s aplikáciou rozpúšťadla sa preukazuje, že rozpúšťadlo a testovací systém na seba navzájom nepôsobia, a meria sa aj celková väzba (TB). Uprednostňovaným rozpúšťadlom je etanol. Ak najvyššia koncentrácia testovanej chemikálie nie je rozpustná v etanole, možno prípadne použiť DMSO. Koncentrácia etanolu alebo DMSO, ak sa použije, v konečných skúšobných jamkách je 1,5 % a nesmie prekročiť 2 %.

Kontrola s tlmivým roztokom:

27. Kontrola s tlmivým roztokom (BC) nemá obsahovať rozpúšťadlo ani testovanú chemikáliu, ale má obsahovať všetky ostatné zložky skúšky. Výsledky kontroly s tlmivým roztokom sa porovnajú s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla s cieľom overiť, že použité rozpúšťadlo neovplyvňuje skúšobný systém.

Látka vytvárajúca silnú väzbu (referenčný estrogén)

28. 17β-estradiol (CAS 50-28-2) je endogénny ligand a s vysokou afinitou sa viaže na podtyp alfa estrogénového receptora. Pre každú skúšku kompetitívnej väzby na hrERα sa pripraví štandardná krivka pomocou neoznačeného 17β-estradiolu, aby bolo možné posúdiť variabilitu pri vykonávaní skúšky v priebehu času v rovnakom laboratóriu. Pripraví sa osem roztokov neoznačeného 17β-estradiolu v etanole s koncentráciami v skúšobných jamkách v rozsahu od 100 nM do 10 pM (–7[logM] až –11[logM]) s takýmito rozstupmi: (–7[logM], –8[logM], –8,5[logM], –9[logM], –9,5[logM], –10[logM], –11[logM]). Najvyššia koncentrácia neoznačeného 17β-estradiolu (1 μM) slúži aj ako indikátor nešpecifickej väzby. Táto koncentrácia je v tabuľke 4 odlíšená značkou „NSB“, hoci je takisto súčasťou štandardnej krivky.

Látka vytvárajúca slabú väzbu

29. Použije sa aj látka vytvárajúca slabú väzbu [noretynodrel (CAS 68-23-5) alebo noretindrón (CAS 68-22-4)] s cieľom preukázať citlivosť jednotlivých pokusov a umožniť posúdenie variability pri vykonávaní skúšky v priebehu času. Pripraví sa osem roztokov látky vytvárajúcej slabú väzbu v etanole s koncentráciami v skúšobných jamkách v rozsahu od 3 nM do 30 μM (–8,5[logM] až –4,5[logM]) s takýmito rozstupmi: –4,5[logM], –5[logM], –5,5[logM], –6[logM], –6,5[logM], –7[logM], –7,5[logM], –8,5[logM].

Látka nevytvárajúca väzbu

30. Oktyltrietoxysilán (OTES, CAS 2943-75-1) sa použije ako negatívna kontrola (látka nevytvárajúca väzbu). Poskytuje istotu, že sa pri uskutočnenej skúške rozpozná, keď sa testované chemikálie neviažu na hrERα. Pripraví sa osem roztokov látky nevytvárajúcej väzbu v etanole s koncentráciami v skúšobných jamkách v rozsahu od 0,1 nM do 1000 μM (–10[logM] až –3[logM]) s logaritmickými prírastkami. Di-*n*-butyl-ftalát (DBP) možno použiť ako alternatívnu kontrolnú látku nevytvárajúcu väzbu. Jeho maximálna preukázaná rozpustnosť je –4[logM].

Koncentrácia hrERα

31. Použije sa také množstvo receptora, aké poskytuje špecifickú väzbu 20 ±5 % rádioaktívneho ligandu s koncentráciou 1 nM (pozri odseky 12 – 13 dodatku 2). Roztok hrERα sa musí pripraviť bezprostredne pred použitím.

[3H]-17β-estradiol

32. Koncentrácia [^{3}H]-17β-estradiolu v skúšobných jamkách má byť 1,0 nM.

▼M8

Testované chemikálie

33. V prvom rade je potrebné vykonať test rozpustnosti s cieľom určiť limit rozpustnosti pre jednotlivé testované chemikálie a stanoviť vhodný rozsah koncentrácií, ktorý sa má používať pri vykonávaní testovacieho protokolu. Limit rozpustnosti pre jednotlivé testované chemikálie sa určí najskôr v rozpúšťadle a následne sa potvrdí v podmienkach skúšky. Konečná koncentrácia testovaná v rámci skúšky nemá prekročiť 1 mM. Súčasťou testovania na zistenie rozsahu je kontrola s aplikáciou rozpúšťadla spolu s 8 logaritmickými sériovými riedeniami, pričom sa začína pri maximálnej prijateľnej koncentrácii (napr. 1 mM alebo nižšej podľa limitu rozpustnosti) a zaznamená sa prítomnosť zakalenia alebo zrazeniny (pozri aj odsek 35). Testovaná chemikália sa má testovať pomocou kriviek s odstupmi zodpovedajúcimi 8 logaritmickým koncentráciám, ako boli vymedzené v predchádzajúcom teste na zistenie rozsahu. Koncentrácie v druhom a treťom pokuse sa príslušne upravia, aby sa dosiahlo lepšie charakterizovanie krivky závislosti reakcie od koncentrácie.

34. Riedenia testovanej chemikálie sa pripravia v príslušnom rozpúšťadle (pozri odsek 26 dodatku 2). Ak najvyššia koncentrácia testovanej chemikálie nie je rozpustná v etanole ani v DMSO a pri pridaní ďalšieho rozpúšťadla by jeho koncentrácia v konečnej vzorke prekročila prijateľný limit, najvyššia koncentrácia sa môže znížiť na nasledujú nižšiu koncentráciu. V takom prípade možno za najnižšiu zo série koncentrácií doplniť dodatočnú koncentráciu. Ostatné koncentrácie v sérii zostávajú nezmenené.

35. Roztoky s testovanou chemikáliou je potrebné pri pridávaní do skúšobnej jamky pozorne sledovať, pretože testovaná chemikália sa pri pridaní do skúšobnej jamky môže zraziť. Údaje pre všetky jamky, ktoré obsahujú zrazeninu, sa vylúčia spomedzi údajov použitých na zostrojenie krivky a uvedie sa dôvod vylúčenia.

36. Ak existujú predchádzajúce informácie z iných zdrojov, na základe ktorých možno získať hodnotu log(IC_{50}) testovanej chemikálie, riedenia môže byť vhodné geometricky rozmiestniť [t. j. po 0,5 logaritmickej jednotky okolo očakávanej hodnoty log(IC_{50})]. Z konečného výsledku by malo vyplývať dostatočné rozpätie koncentrácií po oboch stranách hodnoty log(IC_{50}), a to vrátane horného a dolného bodu, aby bolo možné dostatočne charakterizovať väzbovú krivku.

Usporiadanie skúšobnej mikrotitračnej platničky

37. Pripravia sa označené mikrotitračné platničky, pričom sa zohľadní použitie šesťnásobných inkubácií s kódmi pre kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla, najvyššiu koncentráciu referenčného estrogénu, ktorá slúži aj ako indikátor nešpecifickej väzby (NSB), a kontrolu s tlmivým roztokom, ako aj použitie trojnásobných inkubácií s kódmi pre každú z ôsmich koncentrácií kontroly nevytvárajúcej väzbu (oktyltrietoxysilán), každú zo siedmich nižších koncentrácií referenčného estrogénu, každú z ôsmich úrovní koncentrácie dávky pre látku vytvárajúcu slabú väzbu a každú z ôsmich koncentrácií každej testovanej chemikálie (TC). V tabuľke 4 ďalej sa uvádza schéma mikrotitračnej platničky s príkladom rozloženia pre úplné krivky koncentrácie referenčného estrogénu a kontroly. Ďalšie mikrotitračné platničky sa použijú pre testované chemikálie, pričom ich súčasťou sú kontroly na mikrotitračnej platničke, t. j. 1. vysoká (maximálna miera premiestnenia) a stredná (približne na úrovni IC_{50}) koncentrácia E2 a látky vytvárajúcej slabú väzbu, a to každá z nich trojmo; 2. kontrola s aplikáciou rozpúšťadla a nešpecifická väzba, každá z nich šesťkrát (tabuľka 5). Príklad pracovného listu s rozložením na mikrotitračnej platničke pre skúšku kompetitívnej väzby pri použití troch neznámych testovaných chemikálií sa uvádza v dodatku 2.3. Koncentrácie uvedené

▼M8

v tabuľkách 4 a 5 predstavujú konečné koncentrácie skúšky. Maximálna koncentrácia E2 má byť 1×10^{-7} M a v prípade látky vytvárajúcej slabú väzbu sa použije najvyššia koncentrácia pre danú látku vytvárajúcu slabú väzbu na mikrotitračnej platničke 1. Koncentráciu IC_{50} musí stanoviť laboratórium na základe svojej databázy historických kontrol. Očakáva sa, že táto hodnota bude podobná ako hodnota zistená pri validačných štúdiách (pozri tabuľku 1).

Tabuľka 4

Rozloženie na mikrotitračnej platničke pre skúšku kompetitívnej väzby, úplné krivky koncentrácie pre referenčný estrogén a kontroly (mikrotitračná platnička 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (len rozpúšťadlo)			TB (len rozpúšťadlo)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1 \times 10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Slepý pokus (*)		
D	NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1 \times 10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1 \times 10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1 \times 10^{-7,5}$)			NE ($1 \times 10^{-8,5}$)		
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	Slepý pokus (pre označené) (**)			Slepý pokus (pre označené) (**)			Kontrola s tlmivým roztokom			Kontrola s tlmivým roztokom		

V tomto príklade je látkou vytvárajúcou slabú väzbu noretynodrel (NE).
(*) skutočný slepý pokus, jamka sa nepoužíva.
(**) slepý pokus, ktorý sa nepoužíva počas inkubácie, ale slúži na potvrdenie celkovej pridanej rádioaktivity.

Tabuľka 5

Rozloženie na mikrotitračnej platničke pre skúšku kompetitívnej väzby, úplné krivky koncentrácie pre testované chemikálie a kontroly na mikrotitračnej platničke

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (len rozpúšťadlo)			TB (len rozpúšťadlo)			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 ($1 \times 10^{-4,5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10^{-7})		

V tomto príklade je látkou vytvárajúcou slabú väzbu noretynodrel (NE).

▼M8

Dokončenie skúšky kompetitívnej väzby

38. Ako sa uvádza v tabuľke 6, do jamiek sa pridá 80 µl kontroly s aplikáciou rozpúšťadla, kontroly s tlmivým roztokom, referenčného estrogénu, látky vytvárajúcej slabú väzbu, látky nevytvárajúcej väzbu a testovaných chemikálií pripravených v tlmivom skúšobnom roztoku. Potom sa do každej jamky pridá 40 µl roztoku [3H]-17β-estradiolu s koncentráciou 4 nM. Po miernom otáčaní počas 10 až 15 minút pri teplote 2 až 8 °C sa pridá 40 µl roztoku hrERα. Skúšobné mikrotitračné platničky sa inkubujú 16 až 20 hodín pri teplote 2 až 8 °C a počas inkubačného času sú umiestnené v rotátore.

Tabuľka 6

Objem zložiek skúšky kompetitívnej väzby na hrER, mikrotitračné platničky

Objem (µl)	Zložka
80	neoznačený 17β-estradiol, noretynodrel, OTES, testované chemikálie, rozpúšťadlo alebo tlmivý roztok
40	roztok [^{3}H]-17β-estradiolu s koncentráciou 4 nM
40	roztok hrERα v stanovenej koncentrácii
160	***celkový objem v každej skúšobnej jamke***

39. Ďalej sa po separácii [^{3}H]-17β-estradiolu viazaného na hrERα od voľného [^{3}H]-17β-estradiolu pridaním 80 µl studenej suspenzie DCC do každej jamky uskutoční kvantifikácia tohto [^{3}H]-17β-estradiolu viazaného na hrERα, ako sa opisuje v odsekoch 20 – 23 pre skúšku saturačnej väzby.

40. Jamky H1 – 6 [uvedené v tabuľke 4 ako slepý pokus (pre označené)] predstavujú hodnotu dpm estradiolu označeného pomocou [^{3}H] v objeme 40 µl. Alikvotná časť v objeme 40 µl sa prenesie priamo do scintilačnej kvapaliny v jamkách H1 – H6.

Kritériá Prijateľnosti

Skúška saturačnej väzby

41. Pri použití zvyšujúcich sa koncentrácií [^{3}H]-17β-estradiolu má krivka špecifickej väzby dosiahnuť časť s rovnovážnym priebehom, čo potvrdzuje, že došlo k saturácii hrERα ligandom.

42. Špecifická väzba pri koncentrácii 1 nM [3H]-17β-estradiolu má byť v rámci prijateľného rozsahu 15 % až 25 % priemernej nameranej celkovej rádioaktivity pridanej v jednotlivých testovacích cykloch. Občasné mierne odchýlky mimo tohto rozsahu sú prijateľné, ak však testovacie cykly sústavne vedú k výsledkom mimo tohto rozsahu alebo ak je výsledok určitého testovacieho cyklu výrazne mimo tohto rozsahu, je potrebné upraviť koncentráciu bielkoviny a zopakovať skúšku saturácie.

43. Na základe údajov má vzniknúť lineárne Scatchardovo znázornenie.

44. Nešpecifická väzba nemá byť nadmerná. Hodnota nešpecifickej väzby má zvyčajne predstavovať < 35 % celkovej väzby. Pri meraní veľmi nízkej hodnoty dpm pre najnižšiu testovanú koncentráciu 17β-estradiolu označeného rádioizotopom však môže príslušný pomer príležitostne prekročiť tento limit.

▼**M8**

Skúška kompetitívnej väzby

45. Pri zvyšujúcich sa koncentráciách neoznačeného 17β-estradiolu má dôjsť k premiestneniu [^{3}H]-17β-estradiolu z receptora spôsobom, ktorý zodpovedá kompetitívnej väzbe na jedno miesto.

46. Hodnota IC_{50} pre referenčný estrogén (t. j. 17β-estradiol) sa má približne rovnať súčtu molárnej koncentrácie [^{3}H]-17β-estradiolu a hodnoty K_d určenej v skúške saturačnej väzby.

47. Celková špecifická väzba má byť konzistentne v prijateľnom rozsahu 20 ±5 % v prípade priemernej nameranej koncentrácie celkovej rádioaktivity pridanej do každej jamky na úrovni 1 nM v jednotlivých testovacích cykloch. Občasné mierne odchýlky mimo tohto rozsahu sú prijateľné, ak však testovacie cykly sústavne vedú k výsledkom mimo tohto rozsahu alebo ak je výsledok určitého testovacieho cyklu výrazne mimo tohto rozsahu, je potrebné upraviť koncentráciu bielkoviny.

48. Rozpúšťadlo nemá meniť citlivosť ani reprodukovateľnosť skúšky. Výsledky kontroly s aplikáciou rozpúšťadla (jamky TB) sa porovnajú s kontrolou s tlmivým roztokom s cieľom overiť, že použité rozpúšťadlo neovplyvňuje skúšobný systém. Ak nedochádza k vplyvu rozpúšťadla na skúšku, výsledky kontroly TB a kontroly s tlmivým roztokom majú byť porovnateľné.

49. Látka nevytvárajúca väzbu nemá premiestniť z hrERα viac než 25 % [^{3}H]-17β-estradiolu pri testovaní do 10^{-3} M (OTES) alebo 10^{-4} M (DBP).

50. Boli vytvorené kritériá výkonnosti pre referenčný estrogén a dve látky vytvárajúce slabú väzbu (napr. noretynodrel, noretindrón) pomocou údajov z validačnej štúdie skúšky FW väzby na hrER (príloha N v odkaze 2). 95 % intervaly spoľahlivosti sa uvádzajú pre priemer (n) +/– SD pre všetky kontrolné testovacie cykly v laboratóriách zapojených do validačnej štúdie. 95 % intervaly spoľahlivosti sa vypočítali pre parametre zostrojenia krivky [t. j. horný bod, dolný bod, sklon krivky podľa Hillovej rovnice (Hillslope), logIC_{50}] pre referenčný estrogén a látky vytvárajúce slabú väzbu a pre log_{10}RBA látok vytvárajúcich slabú väzbu vzhľadom na referenčný estrogén a uvádzajú sa ako kritériá výkonnosti pre pozitívne kontroly. V tabuľke 1 sa uvádzajú očakávané rozsahy pre parametre zostrojenia krivky, ktoré možno použiť ako kritériá výkonnosti. V praxi sa rozsah IC_{50} môže mierne líšiť na základe hodnoty K_d prípravku s receptorom a koncentrácie ligandu.

51. Pokiaľ ide o testované chemikálie, neboli pre ne vytvorené žiadne kritériá výkonnosti pre parametre zostrojenia krivky, a to vzhľadom na široké spektrum existujúcich potenciálnych testovaných chemikálií a variabilitu potenciálnych afinít a výsledkov (napr. úplná krivka, čiastočná krivka, nemožnosť zostrojenia krivky). Pri posudzovaní výsledkov v prípade testovanej chemikálie z jednotlivých testovacích cyklov je však potrebné postupovať na základe odborného úsudku. Je potrebné použiť dostatočný rozsah koncentrácií testovanej chemikálie, aby bolo možné jednoznačne určiť vrchol (napr. 90 – 100 % väzby) krivky kompetitívnej väzby. Variabilita medzi replikátmi pri jednotlivých koncentráciách testovanej chemikálie, ako aj medzi tromi nesúbežnými testovacími cyklami má byť primeraná a vedecky odôvodniteľná. Kontroly z jednotlivých testovacích cyklov testovanej chemikálie sa majú približovať mieram výkonnosti uvádzaným pre túto skúšku FW a majú byť v súlade s údajmi o historických kontrolách z jednotlivých príslušných laboratórií.

▼M8

ANALÝZA ÚDAJOV

Skúška saturačnej väzby

52. Meria sa celková väzba, ako aj nešpecifická väzba. Z týchto hodnôt sa vypočíta špecifická väzba zvyšujúcich sa koncentrácií [^{3}H]-17β-estradiolu v rovnovážnych podmienkach, a to odpočítaním hodnoty nešpecifickej väzby od celkovej väzby. Graf špecifickej väzby vzhľadom na koncentráciu [^{3}H]-17β-estradiolu by mal dosiahnuť časť s rovnovážnym priebehom pri maximálnej špecifickej väzbe, čo signalizuje saturáciu hrERα [^{3}H]-17β-estradiolom. Okrem toho by sa analýzou údajov malo zdokumentovať naviazanie [^{3}H]-17β-estradiolu na jedno väzbové miesto s vysokou afinitou. Na krivke saturačnej väzby sa má znázorniť nešpecifická, celková a špecifická väzba. Pri ďalšej analýze týchto údajov sa použije nelineárna regresná analýza (napr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) s konečným zobrazením týchto údajov v podobe Scatchardovho znázornenia.

53. Pri analýze údajov sa údaje B_{max} a K_d určujú len z údajov o celkovej väzbe, a to na základe predpokladu, že nešpecifická väzba je lineárna, pokiaľ nie je odôvodnené použitie odlišnej metódy. Pri stanovení najlepšieho zostrojenia sa má okrem toho použiť spoľahlivá regresia, pokiaľ nie je uvedené iné odôvodnenie. Zvolenú metódu spoľahlivej regresie je potrebné uviesť. Pri určovaní hodnôt B_{max} a K_d z údajov o saturačnej väzbe sa má vždy použiť korekcia vzhľadom na zníženie počtu ligandov (napr. pomocou Swillensovej metódy, 1995).

Skúška kompetitívnej väzby

54. Krivka kompetitívnej väzby sa zostrojí tak, aby vyjadrovala vzťah medzi špecifickou väzbou [^{3}H]-17β-estradiolu a koncentráciou (jednotky dekadického logaritmu) konkurenta. Koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej dochádza k inhibícii 50 % maximálnej špecifickej väzby [^{3}H]-17β-estradiolu, predstavuje hodnotu IC_{50}.

55. Odhady hodnôt log(IC_{50}) pre pozitívne kontroly (napr. referenčný estrogén a látku vytvárajúcu slabú väzbu) sa určia pomocou vhodného softvéru na zostrojenie krivky nelineárnej funkcie v súlade s Hillovou rovnicou so štyrmi parametrami (napr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Horný bod, dolný bod, sklon a hodnota log(IC_{50}) majú pri zostrojovaní týchto kriviek zostať vo všeobecnosti bez obmedzení. Pri stanovení najlepšieho zostrojenia sa má použiť spoľahlivá regresia, pokiaľ nie je uvedené iné odôvodnenie. Nepoužíva sa korekcia vzhľadom na zníženie počtu ligandov. Po počiatočnej analýze sa každá väzbová krivka posúdi, aby sa zabezpečilo, že je primerane zostrojená podľa modelu. Relatívna afinita (RBA) látky vytvárajúcej slabú väzbu sa vypočíta ako percentuálny podiel hodnoty log(IC_{50}) látky vytvárajúcej slabú väzbu vzhľadom na hodnotu log(IC_{50}) pre 17β-estradiol. Výsledky z pozitívnych kontrol a z kontroly s látkou nevytvárajúcou väzbu sa vyhodnotia pomocou meraní výkonnosti skúšky uvedených v odsekoch 45 – 50 v tomto dodatku 2.

56. Na analýzu údajov pre všetky testované chemikálie sa použije prístup v postupných krokoch, aby sa zabezpečila primeraná analýza všetkých údajov a správna klasifikácia jednotlivých kriviek kompetitívnej väzby. Odporúča sa, aby sa pri každom testovacom cykle pre testovanú chemikáliu uskutočnila štandardizovaná analýza údajov, ktorá sa zhoduje s analýzou použitou v prípade kontrol s referenčným estrogénom a látkou vytvárajúcou slabú väzbu (pozri odsek 55). Po jej dokončení sa uskutoční technické posúdenie parametrov zostrojenia krivky a vizuálna kontrola toho, nakoľko údaje zodpovedajú vygenerovanej krivke kompetitívnej väzby pri každom testovacom cykle. Vhodným ukazovateľom správneho uskutočnenia skúšky a analýz údajov počas tohto technického posúdenia je to, keď sa pozoruje zníženie percentuálneho podielu špecificky viazaného [^{3}H]-17β-estradiolu v závislosti od koncentrácie, nízka variabilita medzi technickými replikátmi pri jednotlivých chemických koncentráciách a konzistentnosť parametrov zostrojenia medzi tromi testovacími cyklami.

▼M8

Interpretácia údajov

57. Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, testovaná chemikália sa pokladá za látku vytvárajúcu väzbu na hrERα, ak možno zostrojiť väzbovú krivku a najnižší bod na krivke reakcie v rámci rozsahu údajov predstavuje hodnotu nižšiu než 50 % (obrázok 1).

58. Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, testovaná chemikália sa pokladá za látku nevytvárajúcu väzbu na hrERα, ak:

— možno zostrojiť väzbovú krivku a najnižší bod na zostrojenej krivke reakcie v rámci rozsahu údajov predstavuje hodnotu vyššiu než 75 % alebo

— nemožno zostrojiť väzbovú krivku a najnižšia nevyhladená priemerná percentuálna hodnota väzby medzi skupinami koncentrácií v údajoch predstavuje hodnotu vyššiu než 75 %.

59. Testovaná chemikália sa pokladá za nejednoznačnú, ak nie je splnená ani jedna z uvedených podmienok (napr. najnižší bod na zostrojenej krivke reakcie je v rozsahu 76 – 51 %).

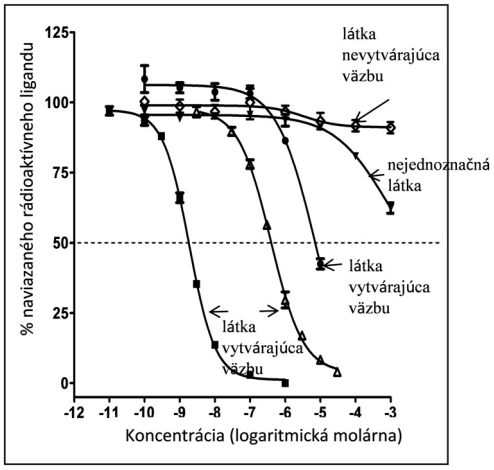
Tabuľka 7

Kritériá na priradenie klasifikácie na základe krivky kompetitívnej väzby testovanej chemikálie

Klasifikácia	Kritériá
Látka vytvárajúca väzbu[a]	Je možné zostrojiť väzbovú krivku. **Najnižší bod na krivke reakcie v rámci rozsahu údajov predstavuje hodnotu nižšiu než 50 %.**
Látka nevytvárajúca väzbu[b]	Ak je možné zostrojiť väzbovú krivku, **najnižší bod na zostrojenej krivke reakcie v rámci rozsahu údajov predstavuje hodnotu vyššiu než 75 %.** Ak nie je možné zostrojiť väzbovú krivku, **najnižšia nevyhladená priemerná percentuálna hodnota väzby medzi skupinami koncentrácií v údajoch predstavuje hodnotu vyššiu než 75 %.**
Nejednoznačná látka[c]	Akýkoľvek uskutočniteľný testovací cyklus, ktorého výsledkom nie je látka vytvárajúca väzbu ani látka nevytvárajúca väzbu (napr. najnižší bod na zostrojenej krivke reakcie je v rozsahu 76 – 51 %).

Obrázok 1

Príklady klasifikácie testovanej chemikálie pomocou krivky kompetitívnej väzby.



▼M8

60. Viaceré testovacie cykly uskutočnené pre určitú testovanú chemikáliu v rámci laboratória sa skombinujú tak, že sa každému testovaciemu cyklu priradí číselná hodnota a stanoví sa priemer za testovacie cykly podľa znázornenia v tabuľke 8. Výsledky kombinovaných testovacích cyklov v rámci jednotlivých laboratórií sa porovnajú s očakávanou klasifikáciou jednotlivých testovaných chemikálií.

Tabuľka 8

Metóda klasifikácie testovanej chemikálie pomocou viacerých testovacích cyklov v rámci laboratória

Priradenie hodnoty každému testovaciemu cyklu:	
Klasifikácia	**Číselná hodnota**
látka vytvárajúca väzbu	2
nejednoznačná látka	1
látka nevytvárajúca väzbu	0
Klasifikácia priemeru číselných hodnôt medzi testovacími cyklami:	
Klasifikácia	**Číselná hodnota**
látka vytvárajúca väzbu	priemer $\geq$ 1,5
nejednoznačná látka	0,5 $\leq$ priemer $<$ 1,5
látka nevytvárajúca väzbu	priemer $<$ 0,5

SPRÁVA O TESTE

61. Pozri odsek 24 v časti **ZLOŽKY SKÚŠKY VÄZBY NA hrER** tejto testovacej metódy.

▼**M8**

Dodatok 2.1

ZOZNAM TERMÍNOV

[^{3}H]E2: 17β-estradiol rádioaktívne označený tríciom

DCC: uhlie povrchovo upravené dextránom

E_2: neoznačený 17β-estradiol (inertný)

Tlmivý skúšobný roztok: tris 10 mM, bovinný sérový albumín 10 mg/ml, DTT 2 mM, glycerol 10 %, leupeptín 0,2 mM, pH 7,5

hrERα: ľudský rekombinantný estrogénový receptor alfa

Replikát: jedna z viacerých jamiek, ktoré obsahujú rovnaký obsah v rovnakých koncentráciách a skúšajú sa súbežne v rámci jedného testovacieho cyklu. V tomto protokole sa každá koncentrácia testovanej chemikálie testuje trojmo, t. j. existujú tri replikáty, ktoré sa skúšajú súbežne pri jednotlivých koncentráciách testovanej chemikálie.

Testovací cyklus: úplná množina súbežne spracúvaných skúšobných jamiek na mikrotitračnej platničke, ktorá poskytuje všetky informácie potrebné na charakterizovanie väzby testovanej chemikálie na hrERα (t. j. celkový [^{3}H]-17β-estradiol pridaný do skúšobnej jamky, maximálna väzba [^{3}H]-17β-estradiolu na hrERα, nešpecifická väzba a celková väzba pri rôznych koncentráciách testovanej chemikálie). Testovací cyklus by mohol obsahovať len jednu skúšobnú jamku (t. j. replikát) na koncentráciu, ale vzhľadom na to, že v rámci tohto protokolu sa vyžaduje skúšanie trojmo, každý testovací cyklus obsahuje tri skúšobné jamky na koncentráciu. Okrem toho sa v tomto protokole vyžadujú tri nezávislé (t. j. nesúbežné) testovacie cykly na chemikáliu.

▼**M8**

Dodatok 2.2

TYPICKÁ SATURAČNÁ SKÚŠKA [^{3}H]-17B-ESTRADIOLU S TROMI JAMKAMI S REPLIKÁTMI

Typická saturačná skúška [3H]-17β-estradiolu s tromi jamkami s replikátmi											
Pozícia	**Replikát**	**Kód typu jamky**	**Počiatočná koncentrácia označeného E2 (nM)**	**Objem označeného E2 (µl)**	**Konečná koncentrácia označeného E2 (nM)**	**Počiatočná koncentrácia neoznačeného E2 (µM)**	**Objem neoznačeného E2 (µl)**	**Konečná koncentrácia neoznačeného E2 (µM)**	**Objem tlmivého roztoku (µl)**	**Objem receptora (µl)**	**Celkový objem v jamkách**
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

Typická saturačná skúška [3H]-17β-estradiolu s tromi jamkami s replikátmi

Pozícia	Replikát	Kód typu jamky	Počiatočná koncentrácia označeného E2 (nM)	Objem označeného E2 (µl)	Konečná koncentrácia označeného E2 (nM)	Počiatočná koncentrácia neoznačeného E2 (µM)	Objem neoznačeného E2 (µl)	Konečná koncentrácia neoznačeného E2 (µM)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem receptora (µl)	Celkový objem v jamkách
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

Typická saturačná skúška [3H]-17β-estradiolu s tromi jamkami s replikátmi

Pozícia	Replikát	Kód typu jamky	Počiatočná koncentrácia označeného E2 (nM)	Objem označeného E2 (µl)	Konečná koncentrácia označeného E2 (nM)	Počiatočná koncentrácia neoznačeného E2 (µM)	Objem neoznačeného E2 (µl)	Konečná koncentrácia neoznačeného E2 (µM)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem receptora (µl)	Celkový objem v jamkách
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	Označené	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Označené	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Označené	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Označené	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Označené	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Označené	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Označené	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Označené	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Označené	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Označené	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Označené	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Označené	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40

▼M8

Typická saturačná skúška [3H]-17β-estradiolu s tromi jamkami s replikátmi

Pozícia	Replikát	Kód typu jamky	Počiatočná koncentrácia označeného E2 (nM)	Objem označeného E2 (µl)	Konečná koncentrácia označeného E2 (nM)	Počiatočná koncentrácia neoznačeného E2 (µM)	Objem neoznačeného E2 (µl)	Konečná koncentrácia neoznačeného E2 (µM)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem receptora (µl)	Celkový objem v jamkách
H1	1	Označené	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Označené	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Označené	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Označené	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Označené	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Označené	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Označené	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Označené	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Označené	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Označené	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Označené	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Označené	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

„Označené“ jamky sú počas inkubácie prázdne. Objem 40 µl sa pridáva len na účely scintilačnej spektroskopie.

▼**M8**

Dodatok 2.3

ROZLOŽENIE JAMIEK PRI SKÚŠKE KOMPETITÍVNEJ VÄZBY

Mikrotitračná platnička	**Pozícia**	**Replikát**	**Typ jamky**	**Kód jamky**	**Kód koncentrácie**	**Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)**	**Zásoba hrER (µl)**	**Objem tlmivého roztoku (µl)**	**Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)**	**Objem z platničky s riedením (µl)**	**Konečný objem (µl)**	**Konečná koncentrácia konkurenta (M)**
S	A1	1	celková väzba	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	celková väzba	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	celková väzba	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	celková väzba	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	celková väzba	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	celková väzba	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
S	A8	2	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
S	A9	3	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
S	A10	1	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
S	A11	2	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
S	A12	3	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
S	B1	1	neoznačený E2	S	S1	2,00E–07	40	—	40	80	160	1,0E–07
S	B2	2	neoznačený E2	S	S1	2,00E–07	40	—	40	80	160	1,0E–07
S	B3	3	neoznačený E2	S	S1	2,00E–07	40	—	40	80	160	1,0E–07
S	B4	1	neoznačený E2	S	S2	2,00E–08	40	—	40	80	160	1,0E–08

▼**M8**

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
S	B5	2	neoznačený E2	S	S2	2,00E–08	40	—	40	80	160	1,0E–08
S	B6	3	neoznačený E2	S	S2	2,00E–08	40	—	40	80	160	1,0E–08
S	B7	1	neoznačený E2	S	S3	6,00E–09	40	—	40	80	160	3,0E–09
S	B8	2	neoznačený E2	S	S3	6,00E–09	40	—	40	80	160	3,0E–09
S	B9	3	neoznačený E2	S	S3	6,00E–09	40	—	40	80	160	3,0E–09
S	B10	1	neoznačený E2	S	S4	2,00E–09	40	—	40	80	160	1,0E–09
S	B11	2	neoznačený E2	S	S4	2,00E–09	40	—	40	80	160	1,0E–09
S	B12	3	neoznačený E2	S	S4	2,00E–09	40	—	40	80	160	1,0E–09
S	C1	1	neoznačený E2	S	S5	6,00E–10	40	—	40	80	160	3,0E–10
S	C2	2	neoznačený E2	S	S5	6,00E–10	40	—	40	80	160	3,0E–10
S	C3	3	neoznačený E2	S	S5	6,00E–10	40	—	40	80	160	3,0E–10
S	C4	1	neoznačený E2	S	S6	2,00E–10	40	—	40	80	160	1,0E–10
S	C5	2	neoznačený E2	S	S6	2,00E–10	40	—	40	80	160	1,0E–10
S	C6	3	neoznačený E2	S	S6	2,00E–10	40	—	40	80	160	1,0E–10
S	C7	1	neoznačený E2	S	S7	2,00E–11	40	—	40	80	160	1,0E–11
S	C8	2	neoznačený E2	S	S7	2,00E–11	40	—	40	80	160	1,0E–11

▼M8

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
S	C9	3	neoznačený E2	S	S7	2,00E–11	40	—	40	80	160	1,0E–11
S	C10	1	slepý pokus	blank	B1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	slepý pokus	blank	B2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	slepý pokus	blank	B3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	noretynodrel	NE	WP1	6,00E–05	40	—	40	80	160	3,0E–05
S	D2	1	noretynodrel	NE	WP1	6,00E–05	40	—	40	80	160	3,0E–05
S	D3	1	noretynodrel	NE	WP1	6,00E–05	40	—	40	80	160	3,0E–05
S	D4	1	noretynodrel	NE	WP2	2,00E–05	40	—	40	80	160	1,0E–05
S	D5	1	noretynodrel	NE	WP2	2,00E–05	40	—	40	80	160	1,0E–05
S	D6	1	noretynodrel	NE	WP2	2,00E–05	40	—	40	80	160	1,0E–05
S	D7	1	noretynodrel	NE	WP3	6,00E–06	40	—	40	80	160	3,0E–06
S	D8	1	noretynodrel	NE	WP3	6,00E–06	40	—	40	80	160	3,0E–06
S	D9	1	noretynodrel	NE	WP3	6,00E–06	40	—	40	80	160	3,0E–06
S	D10	1	noretynodrel	NE	WP4	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
S	D11	1	noretynodrel	NE	WP4	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
S	D12	1	noretynodrel	NE	WP4	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
S	E1	1	noretynodrel	NE	WP	6,00E–07	40		40	80	160	3,0E–07
S	E2	2	noretynodrel	NE	WP	6,00E–07	40		40	80	160	3,0E–07
S	E3	3	noretynodrel	NE	WP	6,00E–07	40		40	80	160	3,0E–07
S	E4	1	noretynodrel	NE	WP	2,00E–07	40		40	80	160	1,0E–07
S	E5	2	noretynodrel	NE	WP	2,00E–07	40		40	80	160	1,0E–07
S	E6	3	noretynodrel	NE	WP	2,00E–07	40		40	80	160	1,0E–07
S	E7	1	noretynodrel	NE	WP	6,00E–08	40	—	40	80	160	3,0E–08

▼**M8**

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
S	E8	2	noretynodrel	NE	WP	6,00E–08	40	—	40	80	160	3,0E–08
S	E9	3	noretynodrel	NE	WP	6,00E–08	40	—	40	80	160	3,0E–08
S	E10	1	noretynodrel	NE	WP	6,00E–09	40	—	40	80	160	3,0E–09
S	E11	2	noretynodrel	NE	WP	6,00E–09	40	—	40	80	160	3,0E–09
S	E12	3	noretynodrel	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**

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (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	označené	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	označené	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	označené	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	označené	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	označené	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	označené	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

„Označené“ jamky sú počas inkubácie prázdne. Objem 40 µl sa pridáva len na účely scintilačnej spektroskopie.

▼M8

Rozloženie jamiek pri skúške kompetitívnej väzby

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením(µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
P1	A1	1	celková väzba	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	celková väzba	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	celková väzba	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	celková väzba	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	celková väzba	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	celková väzba	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
P1	A8	2	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
P1	A9	3	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
P1	A10	1	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
P1	A11	2	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
P1	A12	3	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S0	2,00E–06	40	—	40	80	160	1,0E–06
P1	B1	1	Testovaná chemikália 1	TC1	1	2,00E–03	40	0	40	80	160	1,0E–03
P1	B2	2	Testovaná chemikália 1	TC1	1	2,00E–03	40	0	40	80	160	1,0E–03
P1	B3	3	Testovaná chemikália 1	TC1	1	2,00E–03	40	0	40	80	160	1,0E–03
P1	B4	1	Testovaná chemikália 1	TC1	2	2,00E–04	40	0	40	80	160	1,0E–04
P1	B5	2	Testovaná chemikália 1	TC1	2	2,00E–04	40	0	40	80	160	1,0E–04
P1	B6	3	Testovaná chemikália 1	TC1	2	2,00E–04	40	0	40	80	160	1,0E–04
P1	B7	1	Testovaná chemikália 1	TC1	3	2,00E–05	40	0	40	80	160	1,0E–05
P1	B8	2	Testovaná chemikália 1	TC1	3	2,00E–05	40	0	40	80	160	1,0E–05
P1	B9	3	Testovaná chemikália 1	TC1	3	2,00E–05	40	0	40	80	160	1,0E–05
P1	B10	1	Testovaná chemikália 1	TC1	4	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–06
P1	B11	2	Testovaná chemikália 1	TC1	4	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–06
P1	B12	3	Testovaná chemikália 1	TC1	4	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–06

▼M8

Rozloženie jamiek pri skúške kompetitívnej väzby

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením(µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
P1	C1	1	Testovaná chemikália 1	TC1	5	2,00E–07	40	0	40	80	160	1,0E–07
P1	C2	2	Testovaná chemikália 1	TC1	5	2,00E–07	40	0	40	80	160	1,0E–07
P1	C3	3	Testovaná chemikália 1	TC1	5	2,00E–07	40	0	40	80	160	1,0E–07
P1	C4	1	Testovaná chemikália 1	TC1	6	2,00E–08	40	0	40	80	160	1,0E–08
P1	C5	2	Testovaná chemikália 1	TC1	6	2,00E–08	40	0	40	80	160	1,0E–08
P1	C6	3	Testovaná chemikália 1	TC1	6	2,00E–08	40	0	40	80	160	1,0E–08
P1	C7	1	Testovaná chemikália 1	TC1	7	2,00E–09	40	0	40	80	160	1,0E–09
P1	C8	2	Testovaná chemikália 1	TC1	7	2,00E–09	40	0	40	80	160	1,0E–09
P1	C9	3	Testovaná chemikália 1	TC1	7	2,00E–09	40	0	40	80	160	1,0E–09
P1	C10	1	Testovaná chemikália 1	TC1	8	2,00E–10	40	0	40	80	160	1,0E–10
P1	C11	2	Testovaná chemikália 1	TC1	8	2,00E–10	40	0	40	80	160	1,0E–10
P1	C12	3	Testovaná chemikália 1	TC1	8	2,00E–10	40	0	40	80	160	1,0E–10
P1	D1	1	Testovaná chemikália 2	TC2	1	2,00E–03	40	0	40	80	160	1,0E–03
P1	D2	2	Testovaná chemikália 2	TC2	1	2,00E–03	40	0	40	80	160	1,0E–03
P1	D3	3	Testovaná chemikália 2	TC2	1	2,00E–03	40	0	40	80	160	1,0E–03
P1	D4	1	Testovaná chemikália 2	TC2	2	2,00E–04	40	0	40	80	160	1,0E–04
P1	D5	2	Testovaná chemikália 2	TC2	2	2,00E–04	40	0	40	80	160	1,0E–04
P1	D6	3	Testovaná chemikália 2	TC2	2	2,00E–04	40	0	40	80	160	1,0E–04
P1	D7	1	Testovaná chemikália 2	TC2	3	2,00E–05	40	0	40	80	160	1,0E–05
P1	D8	2	Testovaná chemikália 2	TC2	3	2,00E–05	40	0	40	80	160	1,0E–05
P1	D9	3	Testovaná chemikália 2	TC2	3	2,00E–05	40	0	40	80	160	1,0E–05
P1	D10	1	Testovaná chemikália 2	TC2	4	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–06
P1	D11	2	Testovaná chemikália 2	TC2	4	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–06
P1	D12	3	Testovaná chemikália 2	TC2	4	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–06

▼M8

Rozloženie jamiek pri skúške kompetitívnej väzby

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením(µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
P1	E1	1	Testovaná chemikália 2	TC2	5	2,00E–07	40	0	40	80	160	1,0E–07
P1	E2	2	Testovaná chemikália 2	TC2	5	2,00E–07	40	0	40	80	160	1,0E–07
P1	E3	3	Testovaná chemikália 2	TC2	5	2,00E–07	40	0	40	80	160	1,0E–07
P1	E4	1	Testovaná chemikália 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E–08
P1	E5	2	Testovaná chemikália 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E–08
P1	E6	3	Testovaná chemikália 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E–08
P1	E7	1	Testovaná chemikália 2	TC2	7	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–09
P1	E8	2	Testovaná chemikália 2	TC2	7	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–09
P1	E9	3	Testovaná chemikália 2	TC2	7	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–09
P1	E10	1	Testovaná chemikália 2	TC2	8	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–10
P1	E11	2	Testovaná chemikália 2	TC2	8	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–10
P1	E12	3	Testovaná chemikália 2	TC2	8	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–10
P1	F1	1	Testovaná chemikália 3	TC3	1	2,00E–03	40	0	40	80	160	1,0E–03
P1	F2	2	Testovaná chemikália 3	TC3	1	2,00E–03	40	0	40	80	160	1,0E–03
P1	F3	3	Testovaná chemikália 3	TC3	1	2,00E–03	40	0	40	80	160	1,0E–03
P1	F4	1	Testovaná chemikália 3	TC3	2	2,00E–04	40	0	40	80	160	1,0E–04
P1	F5	2	Testovaná chemikália 3	TC3	2	2,00E–04	40	0	40	80	160	1,0E–04
P1	F6	3	Testovaná chemikália 3	TC3	2	2,00E–04	40	0	40	80	160	1,0E–04
P1	F7	1	Testovaná chemikália 3	TC3	3	2,00E–05	40	0	40	80	160	1,0E–05
P1	F8	2	Testovaná chemikália 3	TC3	3	2,00E–05	40	0	40	80	160	1,0E–05
P1	F9	3	Testovaná chemikália 3	TC3	3	2,00E–05	40	0	40	80	160	1,0E–05
P1	F10	1	Testovaná chemikália 3	TC3	4	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–06
P1	F11	2	Testovaná chemikália 3	TC3	4	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–06
P1	F12	3	Testovaná chemikália 3	TC3	4	2,00E–06	40	0	40	80	160	1,0E–06

▼M8

Rozloženie jamiek pri skúške kompetitívnej väzby

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením(µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
P1	G1	1	Testovaná chemikália 3	TC3	5	2,00E–07	40	0	40	80	160	1,0E–07
P1	G2	2	Testovaná chemikália 3	TC3	5	2,00E–07	40	0	40	80	160	1,0E–07
P1	G3	3	Testovaná chemikália 3	TC3	5	2,00E–07	40	0	40	80	160	1,0E–07
P1	G4	1	Testovaná chemikália 3	TC3	6	2,00E–08	40	0	40	80	160	1,0E–08
P1	G5	2	Testovaná chemikália 3	TC3	6	2,00E–08	40	0	40	80	160	1,0E–08
P1	G6	3	Testovaná chemikália 3	TC3	6	2,00E–08	40	0	40	80	160	1,0E–08
P1	G7	1	Testovaná chemikália 3	TC3	7	2,00E–09	40	0	40	80	160	1,0E–09
P1	G8	2	Testovaná chemikália 3	TC3	7	2,00E–09	40	0	40	80	160	1,0E–09
P1	G9	3	Testovaná chemikália 3	TC3	7	2,00E–09	40	0	40	80	160	1,0E–09
P1	G10	1	Testovaná chemikália 3	TC3	8	2,00E–10	40	0	40	80	160	1,0E–10
P1	G11	2	Testovaná chemikália 3	TC3	8	2,00E–10	40	0	40	80	160	1,0E–10
P1	G12	3	Testovaná chemikália 3	TC3	8	2,00E–10	40	0	40	80	160	1,0E–10
P1	H1	1	noretynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretynodrel	NE		1,00E–4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretynodrel	NE		1,00E–4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretynodrel	NE		1,00E–4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	neoznačený E2	S		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	neoznačený E2	S		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	neoznačený E2	S		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	neoznačený E2	S		1,00E–7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	neoznačený E2	S		1,00E–7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	neoznačený E2	S		1,00E–7	40	0	40	80	160	

▼**M8**

Dodatok 3

SKÚŠKA *IN VITRO* VÄZBY NA ESTROGÉNOVÝ RECEPTOR ORGANIZÁCIE CERI (CHEMICALS EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE) POMOCOU ĽUDSKEJ REKOMBINANTNEJ BIELKOVINY ERA S DOMÉNOU VIAŽUCOU LIGAND

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA (POZRI AJ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Pri tejto skúške *in vitro* saturačnej a kompetitívnej väzby na estrogénový receptor (ERα) sa využíva doména viažuca ligand (LBD) ľudského estrogénového receptora ERα (hrERα). Tento model bielkoviny, ktorý vytvorila japonská organizácia CERI (Chemicals Evaluation Research Institute), existuje v podobe fúzneho proteínu glutatión-S-transferázy (GST) a je exprimovaný v *E. coli.* Protokol CERI sa posudzoval v rámci medzinárodnej medzilaboratórnej validačnej štúdie (2), ktorou sa preukázala jeho relevantnosť a spoľahlivosť na zamýšľaný účel tejto skúšky.

2. Táto skúška predstavuje skríningový postup na identifikovanie látok, ktoré sa dokážu viazať na hrERα. Slúži na stanovenie schopnosti testovanej chemikálie konkurovať 17β-estradiolu pri viazaní sa na hrERα-LBD. Súčasťou kvantitatívnych výsledkov skúšky môže byť hodnota IC_{50} (miera koncentrácie testovanej chemikálie, ktorá je potrebná na premiestnenie polovice [^{3}H]-17β-estradiolu z hrERα) a relatívne afinity testovaných chemikálií k hrERα v porovnaní so 17β-estradiolom. Na účely skríningu chemikálií môžu prijateľné kvalitatívne výsledky skúšky zahŕňať klasifikáciu testovaných chemikálií ako látok vytvárajúcich väzbu na hrERα, látok nevytvárajúcich väzbu alebo nejednoznačných látok na základe kritérií opísaných pre väzbové krivky.

3. Pri skúške sa používa ligand označený rádioizotopom, laboratórium preto musí mať povolenie na prácu s rádioaktívnymi materiálmi. Pri všetkých postupoch s rádioizotopmi a nebezpečnými chemikáliami je potrebné dodržiavať nariadenia a postupy opísané vo vnútroštátnych právnych predpisoch.

4. Pred použitím tejto skúšky na regulačné účely je potrebné prečítať si časti **VŠEOBECNÝ ÚVOD** a **ZLOŽKY SKÚŠKY VÄZBY NA hrER**. Vymedzenie pojmov a skratky použité v tomto usmernení na vykonávanie testov sú uvedené v dodatku 1.

PRINCÍPY SKÚŠKY (POZRI AJ ČASŤ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

5. V rámci skúšky väzby na hrERα sa meria schopnosť ligandu označeného rádioizotopom ([^{3}H]17β-estradiol) viazať sa na ER v prítomnosti zvyšujúcich sa koncentrácií testovanej chemikálie (t. j. konkurenta). Testované chemikálie, ktoré sa vyznačujú vysokou afinitou k ER, si konkurujú s ligandom označeným rádioizotopom pri nižšej koncentrácii v porovnaní s chemikáliami, ktorých afinita k receptoru je nižšia.

6. Táto skúška obsahuje dve hlavné zložky: pokus na základe saturačnej väzby, ktorým sa charakterizujú parametre interakcie medzi receptorom a ligandom, po ktorom nasleduje pokus na základe kompetitívnej väzby, ktorým sa charakterizuje vzájomné konkurovanie si testovanej chemikálie a ligandu označeného rádioizotopom pri snahe o naviazanie sa na ER.

▼M8

7. Účelom pokusu na základe saturačnej väzby je charakterizovať konkrétnu šaržu receptorov z hľadiska afinity a počtu v prípravku pre pokus na základe kompetitívnej väzby. Pri pokuse na základe saturačnej väzby sa v rovnovážnych podmienkach meria afinita pevne stanovenej koncentrácie estrogénového receptora k svojmu prirodzenému ligandu (vyjadruje ju disociačná konštanta, K_d) a koncentrácia aktívnych miest receptora (B_{max}).

8. Pri pokuse na základe kompetitívnej väzby sa meria afinita látky z hľadiska konkurovania si s [^{3}H]17β-estradiolom pri viazaní sa na ER. Afinita sa kvantifikuje na základe koncentrácie testovanej chemikálie, pri ktorej v rovnovážnom stave dochádza k inhibícii 50 % špecifickej väzby [^{3}H]17β-estradiolu (označuje sa ako „inhibičná koncentrácia 50 %“ alebo IC_{50}). Vyhodnotenie je možné aj pomocou relatívnej afinity (RBA, vzhľadom na hodnotu IC_{50} estradiolu pri samostatnom meraní v tom istom testovacom cykle). Pri pokuse na základe kompetitívnej väzby sa meria viazanie sa [^{3}H]17β-estradiolu v pevnej stanovenej koncentrácii v prítomnosti širokého rozsahu (osem rádov) koncentrácií testovanej chemikálie. Tieto údaje sa potom prispôsobia, ak je to možné, podobe Hillovej rovnice (Hill, 1910), ktorou sa opisuje premiestnenie rádioaktívneho ligandu látkou vytvárajúcou väzbu, ktorá mu konkuruje na jednom mieste. Rozsah premiestnenia estradiolu označeného rádioizotopom v rovnovážnom stave slúži na charakterizovanie testovanej chemikálie ako látky vytvárajúcej väzbu, nevytvárajúcej väzbu alebo spôsobujúcej nejednoznačnú reakciu.

POSTUP

Preukázanie prijateľnej výkonnosti bielkoviny hrERα

9. Pred bežným vykonávaním skúšok saturačnej a kompetitívnej väzby je potrebné preukázať správnu výkonnosť každej novej šarže hrERα v laboratóriu, v ktorom sa bude používať. Na preukázanie výkonnosti sa použije dvojstupňový postup. Skladá sa z týchto krokov:

— Uskutoční sa skúška saturačnej väzby [3H]-17β-estradiolu s cieľom preukázať špecifickosť a saturáciu hrERα. Na základe nelineárnej regresnej analýzy týchto údajov (napr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) a následného Scatchardovho znázornenia sa zdokumentuje afinita [3H]-17β-estradiolu (K_d) a počet receptorov (B_{max}) pre príslušnú šaržu hrERα.

— Uskutoční sa skúška kompetitívnej väzby pomocou kontrolných látok [referenčný estrogén (17β-estradiol), látka vytvárajúca slabú väzbu (napr. noretynodrel alebo noretindrón) a látka nevytvárajúca väzbu (oktyltrietoxysilán, OTES)]. Každé laboratórium si vytvorí historickú databázu na zdokumentovanie konzistentnosti hodnoty IC_{50} a relevantných hodnôt pre referenčný estrogén a látku vytvárajúcu slabú väzbu medzi pokusmi a rôznymi šaržami hrERα. Okrem toho majú byť parametre kriviek kompetitívnej väzby pre kontrolné látky v rámci hraníc 95 % intervalu spoľahlivosti (pozri tabuľku 1), ktoré sa vytvorili na základe údajov z laboratórií zapojených do validačnej štúdie tejto skúšky (2).

Tabuľka 1

Kritériá výkonnosti vytvorené pre referenčný estrogén a látku vytvárajúcu slabú väzbu, skúška CERI väzby na hrER

Látka	parameter	Stredná hodnota [a]	Štandardná odchýlka (n)	95 % intervaly spoľahlivosti [b]	
				Dolná hranica	Horná hranica
17β-estradiol	Horný bod	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Dolný bod	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43

▼M8

Látka	parameter	Stredná hodnota [a]	Štandardná odchýlka (n)	95 % intervaly spoľahlivosti [b]	
				Dolná hranica	Horná hranica
	Sklon krivky podľa Hillovej rovnice (Hill-slope)	–1,22	0,20 (70)	–1,27	–1,17
	$LogIC_{50}$	–8,93	0,23 (70)	–8,98	–8,87
Noretynodrel	Horný bod	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Dolný bod	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Sklon krivky podľa Hillovej rovnice (Hill-slope)	–1,04	0,21 (68)	–1,09	–0,99
	$LogIC_{50}$	–6,19	0,40 (68)	–6,29	–6,10
Noretindrón [c]	Horný bod	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Dolný bod	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Sklon krivky podľa Hillovej rovnice (Hill-slope)	–1,18	0,32 (23)	–1,31	–1,04
	$LogIC_{50}$	–6,01	0,54 (23)	–6,25	–5,78

[a] Stredná hodnota ± štandardná odchýlka (SD) s veľkosťou vzorky (n) sa vypočítali pomocou odhadov zostrojenia krivky (Hillova rovnica so 4 parametrami) pre kontrolné testovacie cykly uskutočnené v štyroch laboratóriách počas validačnej štúdie (pozri prílohu N v odkaze 2).

[b] 95 % intervaly spoľahlivosti sa uvádzajú ako usmernenie pre kritériá prijateľnosti.

[c] V rámci čiastkovej úlohy 4 počas validačnej štúdie bolo testovanie noretindrónu voliteľné (pozri odkaz 2, pozri čiastkovú úlohu 4). Stredné hodnoty ± SD (n) sa tak vypočítali pomocou odhadov zostrojenia krivky (Hillova rovnica so 4 parametrami) pre kontrolné testovacie cykly uskutočnené v dvoch laboratóriách.
Rozsah IC_{50} bude závisieť od hodnoty K_d prípravku s receptorom a od koncentrácie ligandu označeného rádioizotopom, ktorá sa používala v jednotlivých laboratóriách. Prijateľná bude vhodná úprava z hľadiska rozsahu IC_{50} na základe podmienok použitých pri uskutočnení štúdie.

Preukázanie spôsobilosti laboratória

10. Pozri odseky 17 a 18 a tabuľku 2 v časti **ZLOŽKY SKÚŠKY VÄZBY NA hrER** tejto testovacej metódy. Každá skúška (pre saturačnú a kompetitívnu väzbu) sa skladá z troch nezávislých testovacích cyklov (t. j. s čerstvo pripravenými riedeniami receptora, chemikálií a reagentu) uskutočnených v rôznych dňoch, pričom každý testovací cyklus obsahuje tri replikáty.

Stanovenie koncentrácie receptora (hrER*α*)

11. Koncentrácia aktívneho receptora sa mierne líši v závislosti od šarže a podmienok skladovania. Je preto potrebné stanoviť koncentráciu aktívneho receptora pri jeho prijatí od dodávateľa. Zistí sa tak vhodná koncentrácia aktívneho receptora v čase testovacieho cyklu.

12. V podmienkach zodpovedajúcich kompetitívnej väzbe (t. j. [^{3}H]-estradiol s koncentráciou 0,5 nM) sa nominálne koncentrácie 0,1, 0,2, 0,4 a 0,6 nM receptora inkubujú bez prítomnosti (celková väzba) a v prítomnosti (nešpecifická väzba) neoznačeného estradiolu s koncentráciou 1 μM. Špecifická

▼M8

väzba vypočítaná ako rozdiel celkovej a nešpecifickej väzby sa znázorní v závislosti od nominálnej koncentrácie receptora. Koncentrácia receptora, ktorá poskytuje hodnoty špecifickej väzby zodpovedajúce 40 % pridaného rádioaktívneho indikátora, súvisí so zodpovedajúcou koncentráciou receptora a táto koncentrácia receptora sa má použiť pre pokusy na základe saturačnej a kompetitívnej väzby. Táto podmienka bude často splnená pri konečnej koncentrácii hrER na úrovni 0,2 nM.

13. Ak toto 40 % kritérium opakovane nemožno splniť, je potrebné skontrolovať výskyt potenciálnych chýb v pokusnom systéme. Nesplnenie 40 % kritéria môže signalizovať, že sa v rekombinantnej šarži nachádza veľmi malé množstvo aktívneho receptora. V takom prípade je potrebné zvážiť použitie inej šarže receptora.

Saturačná skúška

14. Osem zvyšujúcich sa koncentrácií [^{3}H]17β-estradiolu sa vyhodnocuje trojmo pri týchto troch podmienkach (pozri tabuľku 2):

a) bez prítomnosti neoznačeného 17β-estradiolu a v prítomnosti ER. Stanovuje sa tak celková väzba meraním rádioaktivity v jamkách, v ktorých sa nachádza len [^{3}H]17β-estradiol,

b) v prítomnosti 2000-násobnej nadmernej koncentrácie neoznačeného 17β-estradiolu oproti označenému 17β-estradiolu a v prítomnosti ER. Zámerom tejto podmienky je saturovať aktívne väzbové miesta neoznačeným 17β-estradiolom a určiť nešpecifickú väzbu meraním rádioaktivity v jamkách. Pri všetkom zvyšnom označenom estradiole, ktorý sa môže naviazať na receptor, sa predpokladá, že sa viaže na nešpecifické miesto, keďže neoznačený estradiol má takú vysokú koncentráciu, že sa viaže na všetky dostupné špecifické miesta na receptore,

c) bez prítomnosti neoznačeného 17β-estradiolu a bez prítomnosti ER (stanovenie celkovej rádioaktivity).

Príprava roztokov [^{3}H]-17β-estradiolu, neoznačeného 17β-estradiolu a hrERα

15. Roztok [^{3}H]-17β-estradiolu s koncentráciou 40 nM sa pripraví zo zásobného roztoku [^{3}H]-17β-estradiolu s koncentráciou 1 μM v DMSO, a to pridaním DMSO (na prípravu koncentrácie 200 nM) a tlmivého skúšobného roztoku pri izbovej teplote (na prípravu koncentrácie 40 nM). Pomocou tohto roztoku s koncentráciou 40 nM sa pripravia série riedení [^{3}H]-17β-estradiolu v rozsahu od 0,313 nM do 40 nM s tlmivým skúšobným roztokom pri izbovej teplote (ako sa uvádza v stĺpci 12 tabuľky 2). Konečné skúšobné koncentrácie v rozsahu od 0,0313 do 4,0 nM sa získajú pridaním 10 μl týchto roztokov do príslušných skúšobných jamiek na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke (pozri tabuľky 2 a 3). Príprava tlmivého skúšobného roztoku, výpočet pôvodného zásobného roztoku [^{3}H]-17β-estradiolu na základe jeho špecifickej aktivity, príprava riedení a stanovenie koncentrácií sa podrobne opisujú v protokole skúšky CERI (2).

16. Riedenia roztokov neoznačeného 17β-estradiolu sa pripravia zo zásobného roztoku 17β-estradiolu s koncentráciou 1 nM pridaním tlmivého skúšobného roztoku, aby sa dosiahlo osem zvyšujúcich sa koncentrácií v pôvodnom rozsahu od 0,625 μM do 80 μM. Konečné skúšobné koncentrácie v rozsahu od 0,0625 do 8 μM sa získajú pridaním 10 μl týchto roztokov do príslušných skúšobných jamiek na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke určenej na meranie nešpecifickej väzby (pozri tabuľky 2 a 3). Príprava riedení neoznačeného 17β-estradiolu sa podrobne opisuje v protokole skúšky CERI (2).

▼**M8**

17. Použije sa koncentrácia receptora so špecifickou väzbou na úrovni 40 ±10 % (pozri odseky 12 – 13). Roztok hrERα sa pripraví s ľadovým tlmivým skúšobným roztokom bezprostredne pred použitím, t. j. po pripravení všetkých jamiek pre celkovú väzbu, nešpecifickú väzbu a samotný označený ligand.

18. 96-jamkové mikrotitračné platničky sa pripravia podľa znázornenia v tabuľke 2, pričom na každú koncentráciu [^{3}H]-17β-estradiolu sa použijú 3 replikáty. Priradenie objemov [^{3}H]-17β-estradiolu, neoznačeného 17β-estradiolu, tlmivého roztoku a receptora sa uvádza v tabuľke 3.

Tabuľka 2

Rozloženie pri skúške saturačnej väzby na mikrotitračnej platničke

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Na meranie TB			Na meranie NSB			Na určenie samotného označeného ligandu				Riedenia neoznačeného E2 v stĺpcoch 4 – 6 mikrotitračnej platničky	Riedenia [3H]E2 v stĺpcoch 1 – 9 mikrotitračnej platničky
A	0,0313 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0313 nM [3H] 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 [3H] 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 [3H] 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 [3H] E2+ 0,5 µM E2+ ER			0,250 nM				5 µM	2,5 nM
E	0,50 nM [^{3}H] E2+ ER			0,50 nM [3H] E2+ 1 µM E2+ ER			0,50 nM				10 µM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H] E2+ ER			1,00 nM [3H] E2+ 2 µM E2+ ER			1,00 nM				20 µM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H] E2+ ER			2,00 nM [3H] E2+ 4 µM E2+ ER			2,00 nM				40 µM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H] E2+ ER			4,00 nM [3H] E2+ 8 µM E2+ ER			4,00 nM				80 µM	40 nM

TB: celková väzba,
NSB: nešpecifická väzba
[^{3}H] E2: [^{3}H]-17β-estradiol
E2: neoznačený 17β-estradiol
(*) Koncentrácie uvedené na tomto mieste predstavujú konečné koncentrácie v jednotlivých jamkách.
(**) Riedenia neoznačeného E2 a [^{3}H] E2 možno pripraviť v inej mikrotitračnej platničke.

▼**M8**

Tabuľka 3

Objemy reagentov na mikrotitračnej platničke saturácie

Číslo stĺpca		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Kroky prípravy		Jamky TB			Jamky NSB			Samotný označený ligand		
Objem zložiek pre vyššie uvedené reakčné jamky a poradie pridania	tlmivý roztok	60 µl			50 µl			90 µl		
	neoznačený E2 zo stĺpca 11 v tabuľke 2	—			10 µl			—		
	[3H]E2 zo stĺpca 12 v tabuľke 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			—		
Celkový reakčný objem		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubácia		**PO DVOJHODINOVEJ INKUBAČNEJ REAKCII**						Kvantifikácia rádioaktivity bezprostredne po príprave. Bez inkubácie		
Ošetrenie pomocou 0,4 % DCC		**Áno**			**Áno**			**Nie**		
Objem 0,4 % DCC		100 µl			100 µl			—		
Filtrácia		Áno			Áno			Nie		
MERANIE DPM										
Kvantifikačný objem pridaný do scintilačnej zmesi		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Ak sa na meranie dpm použije metóda kvapalinovej scintilačnej spektroskopie (LSC), nie je vhodná príprava samotného označeného ligandu na rovnakej skúšobnej mikrotitračnej platničke, na akej sa nachádzajú jamky TB a NSB. Samotný označený ligand je potrebné pripraviť na odlišnej mikrotitračnej platničke.

(**) Ak sa na separáciu DCC používa centrifugácia, metódou LSC sa meria 50 µl supernatantu, aby sa predišlo kontaminácii DCC.

19. Skúšobné mikrotitračné platničky na stanovenie celkovej väzby a nešpecifickej väzby sa inkubujú dve hodiny pri izbovej teplote (22 °C až 28 °C).

Meranie [^{3}H]-17β-estradiolu viazaného na hrERα

20. Po dvojhodinovom inkubačnom čase sa [^{3}H]-17β-estradiol viazaný na hrERα separuje od voľného [^{3}H]-17β-estradiolu pridaním 100 µl ľadovej suspenzie 0,4 % DCC do jamiek. Mikrotitračné platničky sa potom na 10 minút umiestnia na ľad a reakčná zmes a suspenzia DCC sa prefiltrujú prenesením na filter mikrotitračnej platničky s cieľom odstrániť DCC. 100 µl filtrátu sa potom pridá do scintilačnej kvapaliny do fľaštičiek LSC na stanovenie počtu rozpadov za minútu (dpm) na fľaštičku pomocou kvapalinovej scintilačnej spektroskopie.

▼M8

21. Ak filter mikrotitračnej platničky nie je k dispozícii, na odstránenie DCC možno použiť centrifugáciu. 50 µl supernatantu obsahujúceho [^{3}H]-17β-estradiol naviazaný na hrERα sa potom veľmi opatrne odoberie, aby nedošlo ku kontaminácii jamiek dotykom DCC, a použije sa na scintilačnú spektroskopiu.

22. Stav samotného označeného ligandu slúži na určenie počtu rozpadov za minútu (dpm) [^{3}H]-17β-estradiolu pridaného do skúšobných jamiek. Kvantifikáciu rádioaktivity je potrebné uskutočniť bezprostredne po príprave. Tieto jamky sa neinkubujú a neošetrujú pomocou suspenzie DCC, ale ich obsah sa prenesie priamo do scintilačnej kvapaliny. Na základe uvedených mier sa preukazuje množstvo [^{3}H]-17β-estradiolu vyjadrené ako počet rozpadov za minútu, ktoré sa pridalo do každej množiny jamiek na určenie celkovej väzby, resp. nešpecifickej väzby.

Skúška kompetitívnej väzby

23. Pri skúške kompetitívnej väzby sa meria väzba jednej koncentrácie [^{3}H]-17β-estradiolu v prítomnosti zvyšujúcich sa koncentrácií testovanej chemikálie. V rámci jedného testovacieho cyklu sa pri každej koncentrácii použijú tri súbežné replikáty. Okrem toho sa pri každej testovanej chemikálii uskutočnia tri nesúbežné testovacie cykly. Skúška sa pripraví v jednej alebo vo viacerých 96-jamkových mikrotitračných platničkách.

Kontroly

24. Pri vykonávaní skúšky je súčasťou každého pokusu súbežné rozpúšťadlo a kontroly (t. j. referenčný estrogén, látka vytvárajúca slabú väzbu a látka nevytvárajúca väzbu). Úplné krivky koncentrácie pre referenčný estrogén a kontroly (t. j. látka vytvárajúca slabú väzbu a látka nevytvárajúca väzbu) sa majú používať na jednej mikrotitračnej platničke pri každom testovacom cykle. Všetky ostatné platničky obsahujú i) vysokú (maximálna miera premiestnenia, t. j. približne úplné premiestnenie ligandu označeného rádioizotopom) a strednú (približne na úrovni IC_{50}) koncentráciu E2 a látky vytvárajúcej slabú väzbu, a to trojmo; ii) kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla a nešpecifickú väzbu, každú z nich trojmo. Postupy prípravy tlmivého skúšobného roztoku, roztokov [^{3}H]-17β-estradiolu, hrERα a testovanej chemikálie sú podrobne opísané v protokole skúšky CERI (2).

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla:

25. Pomocou kontroly s aplikáciou rozpúšťadla sa preukazuje, že rozpúšťadlo a testovací systém na seba navzájom nepôsobia, a meria sa aj celková väzba (TB). Uprednostňovaným rozpúšťadlom je DMSO. Ak najvyššia koncentrácia testovanej chemikálie nie je rozpustná v DMSO, možno prípadne použiť etanol. Koncentrácia DMSO v konečných skúšobných jamkách má byť 2,05 %, pričom ju možno zvýšiť na 2,5 % v prípade, že nie je zabezpečená rozpustnosť testovanej chemikálie. Koncentrácie DMSO vyššie ako 2,5 % sa nemajú používať z dôvodu interferencie vyšších koncentrácií rozpúšťadla so skúškou. V prípade testovaných chemikálií, ktoré nie sú rozpustné v DMSO, ale sú rozpustné v etanole, možno v skúške použiť etanol v maximálnej koncentrácii 2 % bez toho, aby dochádzalo k interferencii.

Kontrola s tlmivým roztokom:

26. Kontrola s tlmivým roztokom (BC) nemá obsahovať rozpúšťadlo ani testovanú chemikáliu, ale má obsahovať všetky ostatné zložky skúšky. Výsledky kontroly s tlmivým roztokom sa porovnajú s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla s cieľom overiť, že použité rozpúšťadlo neovplyvňuje skúšobný systém.

▼M8

Látka vytvárajúca silnú väzbu (referenčný estrogén)

27. 17β-estradiol (CAS 50-28-2) je endogénny ligand a s vysokou afinitou sa viaže na podtyp alfa estrogénového receptora. Pre každú skúšku kompetitívnej väzby na hrERα sa pripraví štandardná krivka pomocou neoznačeného 17β-estradiolu, aby bolo možné posúdiť variabilitu pri vykonávaní skúšky v priebehu času v rovnakom laboratóriu. Pripraví sa osem roztokov neoznačeného 17β-estradiolu v DMSO a tlmivom skúšobnom roztoku s konečnými koncentráciami v skúšobných jamkách, ktoré sa použijú pre štandardnú krivku, s takýmito rozstupmi: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. Najvyššia koncentrácia neoznačeného 17β-estradiolu (1 μM) slúži ako indikátor nešpecifickej väzby. Táto koncentrácia je v tabuľke 4 odlíšená značkou „NSB“, hoci je takisto súčasťou štandardnej krivky.

Látka vytvárajúca slabú väzbu

28. Použije sa aj látka vytvárajúca slabú väzbu [noretynodrel (CAS 68-23-5) alebo ako alternatíva noretindrón (CAS 68-22-4)] s cieľom preukázať citlivosť jednotlivých pokusov a umožniť posúdenie variability pri vykonávaní skúšky v priebehu času. Pripraví sa osem roztokov látky vytvárajúcej slabú väzbu v DMSO a tlmivom skúšobnom roztoku s takýmito konečnými koncentráciami v skúšobných jamkách: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} a 10^{-9} M.

Látka nevytvárajúca väzbu

29. Oktyltrietoxysilán (OTES, CAS 2943-75-1) sa použije ako negatívna kontrola (látka nevytvárajúca väzbu). Poskytuje istotu, že sa pri uskutočnenej skúške rozpoznajú testované chemikálie, ktoré sa neviažu na hrERα. Pripraví sa osem roztokov látky nevytvárajúcej väzbu v DMSO a tlmivom skúšobnom roztoku s takýmito konečnými koncentráciami v skúšobných jamkách: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Ako alternatívnu látku nevytvárajúcu väzbu možno použiť di-n-butyl-ftalát (DBP, CAS 84-72-2), možno ho však testovať len do koncentrácie 10^{-4} M. Maximálna preukázaná rozpustnosť DBP v skúške je 10^{-4} M.

Koncentrácia hrERα

30. Použije sa také množstvo receptora, aké poskytuje špecifickú väzbu 40 ±10 % (pozri odseky 12 – 13 dodatku 3). Roztok hrERα sa pripraví rozriedením funkčného hrERα v ľadovom tlmivom skúšobnom roztoku bezprostredne pred použitím.

[^{3}H]-17β-estradiol

31. Konečná koncentrácia [^{3}H]-17β-estradiolu v skúšobných jamkách má byť 0,5 nM.

Testované chemikálie

32. V prvom rade je potrebné vykonať test rozpustnosti s cieľom určiť limit rozpustnosti pre jednotlivé testované chemikálie a stanoviť vhodný rozsah koncentrácií, ktorý sa má používať pri vykonávaní testovacieho protokolu. Limit rozpustnosti pre jednotlivé testované chemikálie sa určí najskôr v rozpúšťadle a následne sa potvrdí v podmienkach skúšky. Konečná koncentrácia testovaná v rámci skúšky nemá prekročiť 1 mM. Súčasťou testovania na zistenie rozsahu je kontrola s aplikáciou rozpúšťadla spolu najmenej s 8 logaritmickými sériovými riedeniami, pričom sa začína pri maximálnej prijateľnej koncentrácii (napr. 1 mM alebo menej podľa limitu rozpustnosti) a zaznamená sa prítomnosť zakalenia alebo zrazeniny (pozri aj odsek 35 dodatku 3). Po stanovení rozsahu koncentrácií na testovanie sa testovaná chemikália má testovať pomocou 8 logaritmických koncentrácií s vhodnými rozstupmi, ako boli vymedzené v predchádzajúcom teste na

▼M8

zistenie rozsahu. V prípade potreby sa koncentrácie testované v druhom a treťom pokuse príslušne ďalej upravia, aby sa dosiahlo lepšie charakterizovanie krivky závislosti reakcie od koncentrácie.

33. Riedenia testovanej chemikálie sa pripravia v príslušnom rozpúšťadle (pozri odsek 25 dodatku 3). Ak najvyššia koncentrácia testovanej chemikálie nie je rozpustná v DMSO ani etanole a pri pridaní ďalšieho rozpúšťadla by jeho koncentrácia v konečnej vzorke prekročila prijateľný limit, najvyššia koncentrácia sa môže znížiť na nasledujúcu nižšiu koncentráciu. V takom prípade možno za najnižšiu zo série koncentrácií doplniť dodatočnú koncentráciu. Ostatné koncentrácie v sérii zostávajú nezmenené.

34. Roztoky s testovanou chemikáliou je potrebné pri pridávaní do skúšobnej jamky pozorne sledovať, pretože testovaná chemikália sa pri pridaní do skúšobnej jamky môže zraziť. Údaje pre všetky jamky, ktoré obsahujú zrazeninu, sa vylúčia spomedzi údajov použitých na zostrojenie krivky a uvedie sa dôvod vylúčenia.

35. Ak existujú predchádzajúce informácie z iných zdrojov, na základe ktorých možno získať hodnotu log(IC_{50}) testovanej chemikálie, riedenia môže byť vhodné geometricky rozmiestniť bližšie okolo očakávanej hodnoty log(IC_{50}) (t. j. po 0,5 logaritmickej jednotky). Z konečných výsledkov by malo vyplývať dostatočné rozpätie koncentrácií po oboch stranách hodnoty log(IC_{50}), a to vrátane horného a dolného bodu, aby bolo možné dostatočne charakterizovať väzbovú krivku.

Usporiadanie skúšobnej mikrotitračnej platničky

36. Pomocou šesťnásobných inkubácií sa pripravia označené mikrotitračné platničky určené pre kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla, najvyššiu koncentráciu referenčného estrogénu (E2), ktorá slúži aj ako indikátor nešpecifickej väzby (NSB), a kontrolu s tlmivým roztokom, a trojnásobné inkubácie pre každú z ôsmich koncentrácií kontroly nevytvárajúcej väzbu (oktyltrietoxysilán), sedem nižších koncentrácií referenčného estrogénu (E2), osem koncentrácií látky vytvárajúcej slabú väzbu (noretynodrel alebo noretindrón) a osem koncentrácií každej testovanej chemikálie (TC). V tabuľke 4 ďalej sa uvádza schéma rozloženia mikrotitračnej platničky s príkladom rozloženia pre úplné krivky koncentrácie referenčného estrogénu a kontrol. Ďalšie mikrotitračné platničky sa použijú pre testovanú chemikáliu, pričom ich súčasťou sú kontroly na mikrotitračnej platničke [t. j. i) vysoká (maximálna miera premiestnenia) a stredná (približne na úrovni IC_{50}) koncentrácia E2 a látky vytvárajúcej slabú väzbu, a to trojmo; ii) kontrola s aplikáciou rozpúšťadla (ako celková väzba) a nešpecifická väzba, každá z nich šesťkrát (tabuľka 5)]. Príklad pracovného listu s rozložením na mikrotitračnej platničke pre skúšku kompetitívnej väzby pri použití troch neznámych testovaných chemikálií sa uvádza v dodatku 3.3. Koncentrácie uvedené v pracovnom liste, ako aj v tabuľkách 4 a 5 predstavujú konečné koncentrácie skúšky použité v jednotlivých skúšobných jamkách. Maximálna koncentrácia E2 má byť 1×10^{-7} M a v prípade látky vytvárajúcej slabú väzbu sa použije najvyššia koncentrácia pre danú látku vytvárajúcu slabú väzbu na mikrotitračnej platničke 1. Koncentráciu IC_{50} musí stanoviť laboratórium na základe svojej databázy historických kontrol. Očakáva sa, že táto hodnota bude podobná ako hodnota zistená pri validačných štúdiách (pozri tabuľku 1).

▼M8

Tabuľka 4

Rozloženie na mikrotitračnej platničke pre skúšku kompetitívnej väzby ([1]), ([2]), úplné krivky koncentrácie pre referenčný estrogén a kontroly (mikrotitračná platnička 1)

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Kontrola s tlmivým roztokom a pozitívna kontrola (E2)			Pozitívna látka vytvárajúca slabú väzbu (noretynodrel)			Negatívna kontrola (OTES)			TB a NSB		
A	Slepý pokus (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (kontrola s aplikáciou rozpúšťadla) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1 \times 10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1 \times 10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Kontrola s tlmivým roztokom		
F	E2 ($1 \times 10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1 \times 10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Slepý pokus (pre označené) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1 \times 10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

([1]) Vzorové usporiadanie pre mikrotitračnú platničku so štandardmi, ktoré sa má použiť pri každom pokuse.
([2]) Táto mikrotitračná platnička je pripravená pomocou riedení pripravených na platničke s riedením opísanej pre štandardy v predchádzajúcich častiach.
V tomto príklade je látkou vytvárajúcou slabú väzbu noretynodrel (NE).
(*) skutočný slepý pokus, jamka sa nepoužíva.
(**) slepý pokus, nepoužíva sa počas inkubácie, ale slúži na potvrdenie celkovej pridanej rádioaktivity.

Tabuľka 5

Rozloženie na mikrotitračnej platničke pre skúšku kompetitívnej väzby, dodatočné mikrotitračné platničky pre testované chemikálie (TC) a kontroly na mikrotitračnej platničke

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Testovaná chemikália 1 (TC-1)			Testovaná chemikália 2 (TC-2)			Testovaná chemikália 3 (TC-3)			Kontroly		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 ($1 \times 10_{-7}$ 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 ($1 \times 10_{-4,5}$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 (kontrola s aplikáciou rozpúšťadla)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

V tomto príklade je látkou vytvárajúcou slabú väzbu noretynodrel (NE).

▼M8

Dokončenie skúšky kompetitívnej väzby

37. S výnimkou jamiek pre celkovú väzbu a slepé pokusy (pre označené), ako sa uvádza v tabuľke 6, sa do každej jamky umiestni 50 µl tlmivého skúšobného roztoku, ktorý sa zmieša s 10 µl kontroly s aplikáciou rozpúšťadla, referenčného estrogénu (E2), látky vytvárajúcej slabú väzbu, látky nevytvárajúcej väzbu, resp. testovaných chemikálií a s 10 µl roztoku [3H]-17β-estradiolu s koncentráciou 5 nM. Ďalej sa na každú mikrotitračnú platničku pridá 30 µl ľadového roztoku s receptorom a jemne sa premieša. Roztok hrERα sa pridáva ako posledný reagent. Skúšobné mikrotitračné platničky sa inkubujú dve hodiny pri izbovej teplote (22 až 28 °C).

Tabuľka 6

Objem zložiek skúšky kompetitívnej väzby na hrER, mikrotitračné platničky

Kroky prípravy		Jamky iné ako TB	Jamky TB	Slepý pokus (pre označené)
Objem zložiek pre vyššie uvedené reakčné jamky a poradie pridania	tlmivý skúšobný roztok s izbovou teplotou	50 µl	60 µl	90 µl
	neoznačený E2, látka vytvárajúca slabú väzbu, látka nevytvárajúca väzbu, rozpúšťadlo a testované chemikálie (*)	10 µl	—	—
	[3H]-17β-estradiol na dosiahnutie konečnej koncentrácie 0,5 nM (t. j. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	stanovená koncentrácia hrERα (pozri odseky 12 – 13)	30 µl	30 µl	—
celkový objem v každej skúšobnej jamke		100 µl	100 µl	100 µl

(*) správne pripravené na dosiahnutie konečnej koncentrácie v rámci prijateľnej koncentrácie rozpúšťadla

38. Ďalej sa po separácii [^{3}H]-17β-estradiolu viazaného na hrERα od voľného [^{3}H]-17β-estradiolu pridaním 100 µl ľadovej suspenzie DCC do každej jamky uskutoční kvantifikácia [^{3}H]-17β-estradiolu viazaného na hrERα, ako sa opisuje v odsekoch 21 – 23 dodatku 3 pre skúšku saturačnej väzby.

39. Jamky G10 – 12 a H10 – 12 [uvedené v tabuľke 4 ako slepý pokus (pre označené)] predstavujú hodnotu dpm estradiolu označeného pomocou [^{3}H] v objeme 10 µl. Alikvotná časť v objeme 10 µl sa prenesie priamo do scintilačnej kvapaliny.

Kritériá prijateľnosti

Skúška saturačnej väzby

40. Pri použití zvyšujúcich sa koncentrácií [^{3}H]-17β-estradiolu má krivka špecifickej väzby dosiahnuť časť s rovnovážnym priebehom, čo potvrdzuje, že došlo k saturácii hrERα ligandom.

41. Špecifická väzba pri koncentrácii 0,5 nM [^{3}H]-17β-estradiolu má byť v rámci prijateľného rozsahu 30 % až 50 % priemernej nameranej celkovej rádioaktivity pridanej v jednotlivých testovacích cykloch. Občasné mierne odchýlky mimo tohto rozsahu sú prijateľné, ak však testovacie cykly sústavne vedú k výsledkom mimo tohto rozsahu alebo ak je výsledok určitého testovacieho cyklu výrazne mimo tohto rozsahu, je potrebné upraviť koncentráciu bielkoviny a zopakovať skúšku saturácie.

▼M8

42. Na základe údajov má vzniknúť lineárne Scatchardovo znázornenie.

43. Nešpecifická väzba nemá byť nadmerná. Hodnota nešpecifickej väzby má zvyčajne predstavovať < 35 % celkovej väzby. Pri meraní veľmi nízkej hodnoty dpm pre najnižšiu testovanú koncentráciu 17β-estradiolu označeného rádioizotopom však môže príslušný pomer príležitostne prekročiť tento limit.

Skúška kompetitívnej väzby

44. Pri zvyšujúcich sa koncentráciách neoznačeného 17β-estradiolu má dôjsť k premiestneniu [^{3}H]-17β-estradiolu z receptora spôsobom, ktorý zodpovedá kompetitívnej väzbe na jedno miesto.

45. Hodnota IC_{50} pre referenčný estrogén (t. j. 17β-estradiol) sa má približne rovnať súčtu molárnej koncentrácie [^{3}H]-17β-estradiolu a hodnoty K_d určenej v skúške saturačnej väzby.

46. Celková špecifická väzba má byť konzistentne v prijateľnom rozsahu 40 ±10 % v prípade priemernej nameranej koncentrácie celkovej rádioaktivity pridanej do každej jamky na úrovni 0,5 nM v jednotlivých testovacích cykloch. Občasné mierne odchýlky mimo tohto rozsahu sú prijateľné, ak však testovacie cykly sústavne vedú k výsledkom mimo tohto rozsahu alebo ak je výsledok určitého testovacieho cyklu výrazne mimo tohto rozsahu, je potrebné upraviť koncentráciu bielkoviny.

47. Rozpúšťadlo nemá meniť citlivosť ani reprodukovateľnosť skúšky. Výsledky kontroly s aplikáciou rozpúšťadla (jamky TB) sa porovnajú s kontrolou s tlmivým roztokom s cieľom overiť, že použité rozpúšťadlo neovplyvňuje skúšobný systém. Ak nedochádza k vplyvu rozpúšťadla na skúšku, výsledky kontroly TB a kontroly s tlmivým roztokom majú byť porovnateľné.

48. Látka nevytvárajúca väzbu nemá premiestniť z hrERα viac než 25 % [^{3}H]-17β-estradiolu pri testovaní do 10^{-3} M (OTES) alebo 10^{-4} M (DBP).

49. Boli vytvorené kritériá výkonnosti pre referenčný estrogén a dve látky vytvárajúce slabú väzbu (napr. noretynodrel, noretindrón) pomocou údajov z validačnej štúdie skúšky CERI väzby na hrER (príloha N v odkaze 2). 95 % intervaly spoľahlivosti sa uvádzajú pre strednú hodnotu ± SD (n) pre všetky kontrolné testovacie cykly v štyroch laboratóriách, ktoré sa zapojili do validačnej štúdie. 95 % intervaly spoľahlivosti sa vypočítali pre parametre zostrojenia krivky [t. j. horný bod, dolný bod, sklon krivky podľa Hillovej rovnice (Hillslope) a log IC_{50}] pre referenčný estrogén a látky vytvárajúce slabú väzbu a pre $\log_{10}$RBA látok vytvárajúcich slabú väzbu vzhľadom na referenčný estrogén. V tabuľke 1 sa uvádzajú očakávané rozsahy pre parametre zostrojenia krivky, ktoré možno použiť ako kritériá výkonnosti. V praxi sa rozsah IC_{50} môže mierne líšiť na základe pokusne odvodenej hodnoty K_d prípravku s receptorom a koncentrácie ligandu použitej v rámci skúšky.

50. Pokiaľ ide o testované chemikálie, neboli pre ne vytvorené žiadne kritériá výkonnosti pre parametre zostrojenia krivky, a to vzhľadom na široké spektrum existujúcich potenciálnych testovaných chemikálií a variabilitu potenciálnych afinít a výsledkov (napr. úplná krivka, čiastočná krivka, nemožnosť zostrojenia krivky). Pri posudzovaní výsledkov v prípade testovanej chemikálie z jednotlivých testovacích cyklov je však potrebné postupovať na

▼M8

základe odborného úsudku. Je potrebné použiť dostatočný rozsah koncentrácií testovanej chemikálie, aby bolo možné jednoznačne určiť vrchol (napr. 90 – 100 % väzby) krivky kompetitívnej väzby. Variabilita medzi replikátmi pri jednotlivých koncentráciách testovanej chemikálie, ako aj medzi tromi nesúbežnými testovacími cyklami má byť primeraná a vedecky odôvodniteľná. Kontroly z jednotlivých testovacích cyklov testovanej chemikálie sa majú približovať mieram výkonnosti uvádzaným pre túto skúšku CERI a majú byť v súlade s údajmi o historických kontrolách z jednotlivých príslušných laboratórií.

ANALÝZA ÚDAJOV

Skúška saturačnej väzby

51. Meria sa celková väzba, ako aj nešpecifická väzba. Z týchto hodnôt sa vypočíta špecifická väzba zvyšujúcich sa koncentrácií [^{3}H]-17β-estradiolu v rovnovážnych podmienkach, a to odpočítaním hodnoty nešpecifickej väzby od celkovej väzby. Graf špecifickej väzby vzhľadom na koncentráciu [^{3}H]-17β-estradiolu by mal dosiahnuť časť s rovnovážnym priebehom pri maximálnej špecifickej väzbe, čo signalizuje saturáciu hrERα [^{3}H]-17β-estradiolom. Okrem toho by sa analýzou údajov malo zdokumentovať naviazanie [^{3}H]-17β- estradiolu na jedno väzbové miesto s vysokou afinitou. Na krivke saturačnej väzby sa má znázorniť nešpecifická, celková a špecifická väzba. Pri ďalšej analýze týchto údajov sa použije nelineárna regresná analýza (napr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) s konečným zobrazením týchto údajov v podobe Scatchardovho znázornenia.

52. Pri analýze údajov sa údaje B_{max} a K_d určujú len z údajov o celkovej väzbe, a to na základe predpokladu, že nešpecifická väzba je lineárna, pokiaľ nie je odôvodnené použitie odlišnej metódy. Pri stanovení najlepšieho zostrojenia sa má okrem toho použiť spoľahlivá regresia, pokiaľ nie je uvedené iné odôvodnenie. Zvolenú metódu spoľahlivej regresie je potrebné uviesť. Pri určovaní hodnôt B_{max} a K_d z údajov o saturačnej väzbe sa má vždy použiť korekcia vzhľadom na zníženie počtu ligandov (napr. pomocou Swillensovej metódy, 1995).

Skúška kompetitívnej väzby

53. Krivka kompetitívnej väzby sa zostrojí tak, aby vyjadrovala vzťah medzi špecifickou väzbou [^{3}H]-17β-estradiolu a koncentráciou (jednotky dekadického logaritmu) konkurenta. Koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej dochádza k inhibícii 50 % maximálnej špecifickej väzby [^{3}H]-17β-estradiolu, predstavuje hodnotu IC_{50}.

54. Odhady hodnôt log(IC_{50}) pre pozitívne kontroly (napr. referenčný estrogén a látku vytvárajúcu slabú väzbu) sa určia pomocou vhodného softvéru na zostrojenie krivky nelineárnej funkcie v súlade s Hillovou rovnicou so štyrmi parametrami (napr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Horný bod, dolný bod, sklon a hodnota log(IC_{50}) majú pri zostrojovaní týchto kriviek zostať vo všeobecnosti bez obmedzení. Pri stanovení najlepšieho zostrojenia sa má použiť spoľahlivá regresia, pokiaľ nie je uvedené iné odôvodnenie. Nepoužíva sa korekcia vzhľadom na zníženie počtu ligandov. Po počiatočnej analýze sa každá väzbová krivka posúdi, aby sa zabezpečilo, že je primerane zostrojená podľa modelu. Relatívna afinita (RBA) látky vytvárajúcej slabú väzbu sa vypočíta ako percentuálny podiel hodnoty log(IC_{50}) látky vytvárajúcej slabú väzbu vzhľadom na hodnotu log(IC_{50}) pre 17β-estradiol. Výsledky z pozitívnych kontrol a z kontroly s látkou nevytvárajúcou väzbu sa vyhodnotia pomocou meraní výkonnosti skúšky uvedených v odsekoch 44 – 49 v tomto dodatku 3.

▼M8

55. Na analýzu údajov pre všetky testované chemikálie sa použije prístup v postupných krokoch, aby sa zabezpečila primeraná analýza všetkých údajov a správna klasifikácia jednotlivých kriviek kompetitívnej väzby. Odporúča sa, aby sa pri každom testovacom cykle pre testovanú chemikáliu uskutočnila štandardizovaná analýza údajov, ktorá sa zhoduje s analýzou použitou v prípade kontrol s referenčným estrogénom a látkou vytvárajúcou slabú väzbu (pozri odsek 54 tohto dodatku 3). Po jej dokončení sa uskutoční technické posúdenie parametrov zostrojenia krivky a vizuálna kontrola toho, nakoľko údaje zodpovedajú vygenerovanej krivke kompetitívnej väzby pri každom testovacom cykle. Vhodným ukazovateľom správneho uskutočnenia skúšky a analýz údajov počas tohto technického posúdenia je to, keď sa pozoruje zníženie percentuálneho podielu špecificky viazaného [^{3}H]-17β-estradiolu v závislosti od koncentrácie, nízka variabilita medzi technickými replikátmi pri jednotlivých koncentráciách testovanej chemikálie a konzistentnosť parametrov zostrojenia medzi tromi testovacími cyklami.

Interpretácia údajov

56. Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, testovaná chemikália sa pokladá za látku vytvárajúcu väzbu na hrERα, ak možno zostrojiť väzbovú krivku a najnižší bod na krivke reakcie v rámci rozsahu údajov predstavuje hodnotu nižšiu než 50 % (obrázok 1).

57. Za predpokladu, že sú splnené všetky kritériá prijateľnosti, testovaná chemikália sa pokladá za látku nevytvárajúcu väzbu na hrERα, ak:

— možno zostrojiť väzbovú krivku a najnižší bod na zostrojenej krivke reakcie v rámci rozsahu údajov predstavuje hodnotu vyššiu než 75 % alebo

— nemožno zostrojiť väzbovú krivku a najnižšia nevyhladená priemerná percentuálna hodnota väzby medzi skupinami koncentrácií v údajoch predstavuje hodnotu vyššiu než 75 %.

58. Testovaná chemikália sa pokladá za nejednoznačnú, ak nie je splnená ani jedna z uvedených podmienok (napr. najnižší bod na zostrojenej krivke reakcie je v rozsahu 76 – 51 %).

Tabuľka 7

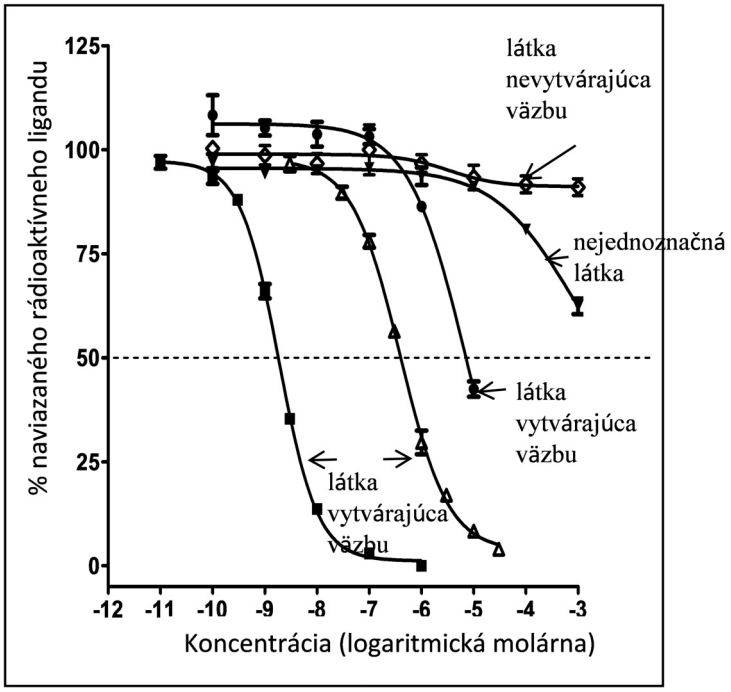
Kritériá na priradenie klasifikácie na základe krivky kompetitívnej väzby testovanej chemikálie

Klasifikácia	Kritériá
Látka vytvárajúca väzbu[a]	Je možné zostrojiť väzbovú krivku. **Najnižší bod na krivke reakcie v rámci rozsahu údajov predstavuje hodnotu nižšiu než 50 %.**
Látka nevytvárajúca väzbu[b]	Ak je možné zostrojiť väzbovú krivku, **najnižší bod na zostrojenej krivke reakcie v rámci rozsahu údajov predstavuje hodnotu vyššiu než 75 %.** Ak nie je možné zostrojiť väzbovú krivku, **najnižšia nevyhladená priemerná percentuálna hodnota väzby medzi skupinami koncentrácií v údajoch predstavuje hodnotu vyššiu než 75 %.**
Nejednoznačná látka[c]	Akýkoľvek uskutočniteľný testovací cyklus, ktorého výsledkom nie je látka vytvárajúca väzbu ani látka nevytvárajúca väzbu (napr. najnižší bod na zostrojenej krivke reakcie je v rozsahu 76 – 51 %).

▼M8

Obrázok 1

Príklady klasifikácie testovanej chemikálie pomocou krivky kompetitívnej väzby.



59. Viaceré testovacie cykly uskutočnené pre určitú testovanú chemikáliu v rámci laboratória sa skombinujú tak, že sa každému testovaciemu cyklu priradí číselná hodnota a stanoví sa priemer za testovacie cykly podľa znázornenia v tabuľke 8. Výsledky kombinovaných testovacích cyklov v rámci jednotlivých laboratórií sa porovnajú s očakávanou klasifikáciou jednotlivých testovaných chemikálií.

Tabuľka 8

Metóda klasifikácie testovanej chemikálie pomocou viacerých testovacích cyklov v rámci laboratória

Priradenie hodnoty každému testovaciemu cyklu:	
Klasifikácia	**Číselná hodnota**
látka vytvárajúca väzbu	2
nejednoznačná látka	1
látka nevytvárajúca väzbu	0

Klasifikácia priemeru číselných hodnôt medzi testovacími cyklami:	
Klasifikácia	**Číselná hodnota**
látka vytvárajúca väzbu	priemer ≥ 1,5
nejednoznačná látka	0,5 ≤ priemer < 1,5
látka nevytvárajúca väzbu	priemer < 0,5

SPRÁVA O TESTE

60. Pozri odsek 24 v časti ZLOŽKY SKÚŠKY VÄZBY NA hrER tejto testovacej metódy.

▼**M8**

Dodatok 3.1

ZOZNAM TERMÍNOV

[^{3}H]E2: 17β-estradiol rádioaktívne označený tríciom

DCC: uhlie povrchovo upravené dextránom

E2: neoznačený 17β-estradiol (inertný)

Tlmivý skúšobný roztok: Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, obsahujúce EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaVO3 1 mM, glycerol 10 %, leupeptín 0,2 mM, ditiotreitol 1 mM a bovinný sérový albumín 10 mg/ml

hrERα: ľudský rekombinantný estrogénový receptor alfa (doména viažuca ligand)

Replikát: jedna z viacerých jamiek, ktoré obsahujú rovnaký obsah v rovnakých koncentráciách a skúšajú sa súbežne v rámci jedného testovacieho cyklu. V tomto protokole sa každá koncentrácia testovanej chemikálie testuje trojmo, t. j. existujú tri replikáty, ktoré sa skúšajú súbežne pri jednotlivých koncentráciách testovanej chemikálie.

Testovací cyklus: úplná množina súbežne spracúvaných skúšobných jamiek na mikrotitračnej platničke, ktorá poskytuje všetky informácie potrebné na charakterizovanie väzby testovanej chemikálie na hrERα (t. j. celkový [^{3}H]-17β-estradiol pridaný do skúšobnej jamky, maximálna väzba [^{3}H]-17β-estradiolu na hrERα, nešpecifická väzba a celková väzba pri rôznych koncentráciách testovanej chemikálie). Testovací cyklus by mohol obsahovať len jednu skúšobnú jamku (t. j. replikát) na koncentráciu, ale vzhľadom na to, že v rámci tohto protokolu sa vyžaduje skúšanie trojmo, každý testovací cyklus obsahuje tri skúšobné jamky na koncentráciu. Okrem toho sa v tomto protokole vyžadujú tri nezávislé (t. j. nesúbežné) testovacie cykly na chemikáliu.

▼**M8**

Dodatok 3.2

ROZLOŽENIE JAMIEK PRI SKÚŠKE KOMPETITÍVNEJ VÄZBY

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
S	A1	1	slepý pokus	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	slepý pokus	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	slepý pokus	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	neoznačený E2	S	S1	1,00E–10	30	50	10	10	100	1,0E–11
S	B2	2	neoznačený E2	S	S1	1,00E–10	30	50	10	10	100	1,0E–11
S	B3	3	neoznačený E2	S	S1	1,00E–10	30	50	10	10	100	1,0E–11
S	C1	1	neoznačený E2	S	S2	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
S	C2	2	neoznačený E2	S	S2	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
S	C3	3	neoznačený E2	S	S2	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
S	D1	1	neoznačený E2	S	S3	3,16E–09	30	50	10	10	100	3,2E–10
S	D2	2	neoznačený E2	S	S3	3,16E–09	30	50	10	10	100	3,2E–10
S	D3	3	neoznačený E2	S	S3	3,16E–09	30	50	10	10	100	3,2E–10
S	E1	1	neoznačený E2	S	S4	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
S	E2	2	neoznačený E2	S	S4	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
S	E3	3	neoznačený E2	S	S4	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
S	F1	1	neoznačený E2	S	S5	3,16E–08	30	50	10	10	100	3,2E–09
S	F2	2	neoznačený E2	S	S5	3,16E–08	30	50	10	10	100	3,2E–09
S	F3	3	neoznačený E2	S	S5	3,16E–08	30	50	10	10	100	3,2E–09
S	G1	1	neoznačený E2	S	S6	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08

▼**M8**

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
S	G2	2	neoznačený E2	S	S6	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
S	G3	3	neoznačený E2	S	S6	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
S	H1	1	neoznačený E2	S	S7	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
S	H2	2	neoznačený E2	S	S7	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
S	H3	3	neoznačený E2	S	S7	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
S	A4	1	noretynodrel	NE	WP1	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
S	A5	2	noretynodrel	NE	WP1	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
S	A6	3	noretynodrel	NE	WP1	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
S	B4	1	noretynodrel	NE	WP2	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
S	B5	2	noretynodrel	NE	WP2	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
S	B6	3	noretynodrel	NE	WP2	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
S	C4	1	noretynodrel	NE	WP3	3,16E–07	30	50	10	10	100	3,2E–08
S	C5	2	noretynodrel	NE	WP3	3,16E–07	30	50	10	10	100	3,2E–08
S	C6	3	noretynodrel	NE	WP3	3,16E–07	30	50	10	10	100	3,2E–08
S	D4	1	noretynodrel	NE	WP4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
S	D5	2	noretynodrel	NE	WP4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
S	D6	3	noretynodrel	NE	WP4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
S	E4	1	noretynodrel	NE	WP5	3,16E–06	30	50	10	10	100	3,2E–07
S	E5	2	noretynodrel	NE	WP5	3,16E–06	30	50	10	10	100	3,2E–07
S	E6	3	noretynodrel	NE	WP5	3,16E–06	30	50	10	10	100	3,2E–07

▼**M8**

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
S	F4	1	noretynodrel	NE	WP6	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
S	F5	2	noretynodrel	NE	WP6	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
S	F6	3	noretynodrel	NE	WP6	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
S	G4	1	noretynodrel	NE	WP7	3,16E–05	30	50	10	10	100	3,2E–06
S	G5	2	noretynodrel	NE	WP7	3,16E–05	30	50	10	10	100	3,2E–06
S	G6	3	noretynodrel	NE	WP7	3,16E–05	30	50	10	10	100	3,2E–06
S	H4	1	noretynodrel	NE	WP8	3,16E–04	30	50	10	10	100	3,2E–05
S	H5	2	noretynodrel	NE	WP8	3,16E–04	30	50	10	10	100	3,2E–05
S	H6	3	noretynodrel	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**

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (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	celková väzba	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	celková väzba	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	celková väzba	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	celková väzba	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
S	B11	5	celková väzba	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	celková väzba	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S1	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
S	C11	2	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S2	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
S	C12	3	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S3	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
S	D10	4	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S4	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
S	D11	5	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06

▼**M8**

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
S	D12	6	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S6	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
S	E10	1	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	kontrola s tlmivým roztokom	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	slepý pokus (pre označené)	Označené	H1	—	90	—	10	—	100	–
S	G11 (*)	2	slepý pokus (pre označené)	Označené	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	slepý pokus (pre označené)	Označené	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	slepý pokus (pre označené)	Označené	H4	—	90	—	10	—	100	—

▼M8

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
S	H11 (*)	5	slepý pokus (pre označené)	Označené	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	slepý pokus (pre označené)	Označené	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	neznáma 1	U1	1	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
P1	A2	2	neznáma 1	U1	1	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
P1	A3	3	neznáma 1	U1	1	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
P1	B1	1	neznáma 1	U1	2	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
P1	B2	2	neznáma 1	U1	2	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
P1	B3	3	neznáma 1	U1	2	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
P1	C1	1	neznáma 1	U1	3	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
P1	C2	2	neznáma 1	U1	3	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
P1	C3	3	neznáma 1	U1	3	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
P1	D1	1	neznáma 1	U1	4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
P1	D2	2	neznáma 1	U1	4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
P1	D3	3	neznáma 1	U1	4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
P1	E1	1	neznáma 1	U1	5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	E2	2	neznáma 1	U1	5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	E3	3	neznáma 1	U1	5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	F1	1	neznáma 1	U1	6	1,00E–04	30	50	10	10	100	1,0E–05
P1	F2	2	neznáma 1	U1	6	1,00E–04	30	50	10	10	100	1,0E–05
P1	F3	3	neznáma 1	U1	6	1,00E–04	30	50	10	10	100	1,0E–05
P1	G1	1	neznáma 1	U1	7	1,00E–03	30	50	10	10	100	1,0E–04
P1	G2	2	neznáma 1	U1	7	1,00E–03	30	50	10	10	100	1,0E–04
P1	G3	3	neznáma 1	U1	7	1,00E–03	30	50	10	10	100	1,0E–04
P1	H1	1	neznáma 1	U1	8	1,00E–02	30	50	10	10	100	1,0E–03
P1	H2	2	neznáma 1	U1	8	1,00E–02	30	50	10	10	100	1,0E–03

▼**M8**

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
P1	H3	3	neznáma 1	U1	8	1,00E–02	30	50	10	10	100	1,0E–03
P1	A4	1	neznáma 2	U2	1	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
P1	A5	2	neznáma 2	U2	1	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
P1	A6	3	neznáma 2	U2	1	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
P1	B4	1	neznáma 2	U2	2	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
P1	B5	2	neznáma 2	U2	2	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
P1	B6	3	neznáma 2	U2	2	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
P1	C4	1	neznáma 2	U2	3	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
P1	C5	2	neznáma 2	U2	3	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
P1	C6	3	neznáma 2	U2	3	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
P1	D4	1	neznáma 2	U2	4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
P1	D5	2	neznáma 2	U2	4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
P1	D6	3	neznáma 2	U2	4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
P1	E4	1	neznáma 2	U2	5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	E5	2	neznáma 2	U2	5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	E6	3	neznáma 2	U2	5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	F4	1	neznáma 2	U2	6	1,00E–04	30	50	10	10	100	1,0E–05
P1	F5	2	neznáma 2	U2	6	1,00E–04	30	50	10	10	100	1,0E–05
P1	F6	3	neznáma 2	U2	6	1,00E–04	30	50	10	10	100	1,0E–05
P1	G4	1	neznáma 2	U2	7	1,00E–03	30	50	10	10	100	1,0E–04
P1	G5	2	neznáma 2	U2	7	1,00E–03	30	50	10	10	100	1,0E–04
P1	G6	3	neznáma 2	U2	7	1,00E–03	30	50	10	10	100	1,0E–04
P1	H4	1	neznáma 2	U2	8	1,00E–02	30	50	10	10	100	1,0E–03
P1	H5	2	neznáma 2	U2	8	1,00E–02	30	50	10	10	100	1,0E–03
P1	H6	3	neznáma 2	U2	8	1,00E–02	30	50	10	10	100	1,0E–03
P1	A7	1	neznáma 3	U3	1	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
P1	A8	2	neznáma 3	U3	1	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10

▼**M8**

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
P1	A9	3	neznáma 3	U3	1	1,00E–09	30	50	10	10	100	1,0E–10
P1	B7	1	neznáma 3	U3	2	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
P1	B8	2	neznáma 3	U3	2	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
P1	B9	3	neznáma 3	U3	2	1,00E–08	30	50	10	10	100	1,0E–09
P1	C7	1	neznáma 3	U3	3	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
P1	C8	2	neznáma 3	U3	3	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
P1	C9	3	neznáma 3	U3	3	1,00E–07	30	50	10	10	100	1,0E–08
P1	D7	1	neznáma 3	U3	4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
P1	D8	2	neznáma 3	U3	4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
P1	D9	3	neznáma 3	U3	4	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,0E–07
P1	E7	1	neznáma 3	U3	5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	E8	2	neznáma 3	U3	5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	E9	3	neznáma 3	U3	5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	F7	1	neznáma 3	U3	6	1,00E–04	30	50	10	10	100	1,0E–05
P1	F8	2	neznáma 3	U3	6	1,00E–04	30	50	10	10	100	1,0E–05
P1	F9	3	neznáma 3	U3	6	1,00E–04	30	50	10	10	100	1,0E–05
P1	G7	1	neznáma 3	U3	7	1,00E–03	30	50	10	10	100	1,0E–04
P1	G8	2	neznáma 3	U3	7	1,00E–03	30	50	10	10	100	1,0E–04
P1	G9	3	neznáma 3	U3	7	1,00E–03	30	50	10	10	100	1,0E–04
P1	H7	1	neznáma 3	U3	8	1,00E–02	30	50	10	10	100	1,0E–03
P1	H8	2	neznáma 3	U3	8	1,00E–02	30	50	10	10	100	1,0E–03
P1	H9	3	neznáma 3	U3	8	1,00E–02	30	50	10	10	100	1,0E–03
P1	A10	1	kontrola E2 (max.)	S	E2max1	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,00E–07
P1	A11	2	kontrola E2 (max.)	S	E2max2	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,00E–07
P1	A12	3	kontrola E2 (max.)	S	E2max3	1,00E–06	30	50	10	10	100	1,00E–07
P1	B10	1	kontrola E2 (IC_{50})	S	E2IC501	E2IC50 × 10	30	50	10	10	100	E2IC50

▼**M8**

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
P1	B11	2	kontrola E2 (IC_{50})	S	E2IC502	E2IC50 × 10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	kontrola E2 (IC_{50})	S	E2IC503	E2IC50 × 10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	C10	1	kontrola NE (max.)	S	Nemax1	1,00E–3,5	30	50	10	10	100	1,00E–4,5
P1	C11	2	kontrola NE (max.)	S	Nemax2	1,00E–3,5	30	50	10	10	100	1,00E–4,5
P1	C12	3	kontrola NE (max.)	S	Nemax3	1,00E–3,5	30	50	10	10	100	1,00E–4,5
P1	D10	1	kontrola NE (IC_{50})	S	NEIC501	NEIC50 × 10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	kontrola NE (IC_{50})	S	NEIC502	NEIC50 × 10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	kontrola NE (IC_{50})	S	NEIC503	NEIC50 × 10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S1	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	E11	2	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S2	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	E12	3	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S3	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	F10	4	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S4	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	F11	5	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S5	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	F12	6	neoznačený E2 (vysoká hodnota)	NSB	S6	1,00E–05	30	50	10	10	100	1,0E–06
P1	G10	1	celková väzba	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	celková väzba	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	celková väzba	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—

▼**M8**

Mikrotitračná platnička	Pozícia	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrácie	Počiatočná koncentrácia konkurenta (M)	Zásoba hrER (µl)	Objem tlmivého roztoku (µl)	Objem značkovacej látky (označeného E2) (µl)	Objem z platničky s riedením (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrácia konkurenta (M)
P1	H10	4	celková väzba	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	celková väzba	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	celková väzba	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	–

(*) „Označené“ jamky sú počas inkubácie prázdne. Objem 10 µl sa pridáva len na účely scintilačnej spektroskopie.

▼**M8**

Dodatok 4

ÚVAHY K ANALÝZE ÚDAJOV ZO SKÚŠKY KOMPETITÍVNEJ VÄZBY NA HRER

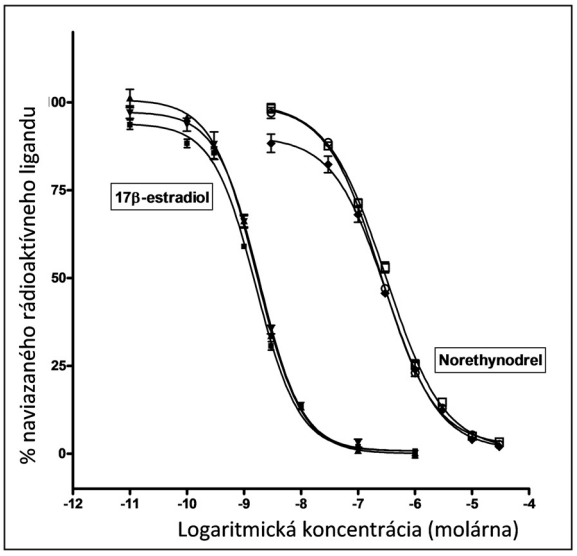
1. Pri skúške kompetitívnej väzby na hrERα sa meria väzba jednej koncentrácie [^{3}H]-17β-estradiolu v prítomnosti zvyšujúcich sa koncentrácií testovanej chemikálie. Krivka kompetitívnej väzby sa zostrojí tak, aby vyjadrovala vzťah medzi špecifickou väzbou [^{3}H]-17β-estradiolu a koncentráciou (jednotky dekadického logaritmu) konkurenta. Koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej dochádza k inhibícii 50 % maximálnej špecifickej väzby [^{3}H]-17β-estradiolu, predstavuje hodnotu IC_{50}.

Analýza údajov pre referenčný estrogén a látku vytvárajúcu slabú väzbu (1)

2. Údaje z kontrolných testovacích cyklov (t. j. percentuálna hodnota špecifickej väzby [^{3}H]-17β-estradiolu a logaritmická koncentrácia testovanej chemikálie) sa transformujú na účely ďalšej analýzy. Odhady hodnôt log(IC_{50}) pre pozitívne kontroly (napr. referenčný estrogén a látku vytvárajúcu slabú väzbu) sa určia pomocou vhodného softvéru na zostrojenie krivky nelineárnej funkcie v súlade s Hillovou rovnicou so štyrmi parametrami (napr. BioSoft; GraphPad Prism) (2). Horný bod, dolný bod, sklon a hodnota log(IC_{50}) môžu pri zostrojovaní týchto kriviek zostať zvyčajne bez obmedzení. Pri stanovení najlepšieho zostrojenia sa má použiť spoľahlivá regresia, pokiaľ nie je uvedené iné odôvodnenie. Zvolenú metódu spoľahlivej regresie je potrebné uviesť. Pri skúškach FW alebo CERI väzby na hrER nebola potrebná korekcia vzhľadom na zníženie počtu ligandov, v prípade potreby však možno zvážiť jej použitie. Po počiatočnej analýze sa každá väzbová krivka posúdi, aby sa zabezpečilo, že je primerane zostrojená podľa modelu. Relatívnu afinitu (RBA) látky vytvárajúcej slabú väzbu možno vypočítať ako percentuálny podiel hodnoty log(IC_{50}) látky vytvárajúcej slabú väzbu vzhľadom na hodnotu log(IC_{50}) pre 17β-estradiol. Výsledky pre pozitívne kontroly a kontrolu s látkou nevytvárajúcou väzbu sa vyhodnotia pomocou meraní výkonnosti skúšky a kritérií prijateľnosti opísaných v tejto testovacej metóde (odsek 20), v dodatku 2 (skúška FW, odseky 41 – 51) a dodatku 3 (skúška CERI, odseky 41 – 51). Príklady troch testovacích cyklov pre referenčný estrogén a látku vytvárajúcu slabú väzbu sú znázornené na obrázku 1.

Obrázok 1

Príklady kriviek kompetitívnej väzby pre referenčný estrogén a kontrolnú látku vytvárajúcu slabú väzbu



▼M8

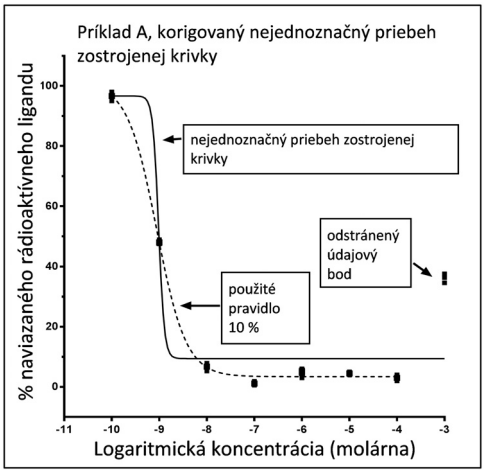
Analýza údajov pre testované chemikálie

3. Na analýzu údajov pre všetky testované chemikálie sa použije prístup v postupných krokoch, aby sa zabezpečila primeraná analýza všetkých údajov a správna klasifikácia jednotlivých kriviek kompetitívnej väzby. Pri každom testovacom cykle pre testovanú chemikáliu sa najskôr uskutoční štandardizovaná analýza údajov, ktorá sa zhoduje s analýzou použitou v prípade kontrol s referenčným estrogénom a látkou vytvárajúcou slabú väzbu. Po jej dokončení sa uskutoční technické posúdenie parametrov zostrojenia krivky a vizuálna kontrola toho, nakoľko údaje zodpovedajú vygenerovanej krivke kompetitívnej väzby pri každom testovacom cykle. Vhodným ukazovateľom správneho uskutočnenia skúšky a analýz údajov počas tohto technického posúdenia je to, keď sa pozoruje zníženie percentuálneho podielu špecificky viazaného [^{3}H]-17β-estradiolu v závislosti od koncentrácie, nízka variabilita medzi technickými replikátmi pri jednotlivých chemických koncentráciách a konzistentnosť parametrov zostrojenia medzi tromi testovacími cyklami. Pri posudzovaní výsledkov v prípade testovanej chemikálie z jednotlivých testovacích cyklov je potrebné postupovať na základe odborného úsudku a údaje, na základe ktorých sa každá testovaná chemikália klasifikuje ako látka vytvárajúca alebo nevytvárajúca väzbu, musia byť vedecky odôvodniteľné.

4. Príležitostne sa môžu vyskytnúť príklady údajov, ktoré si vyžadujú dodatočnú pozornosť s cieľom správne analyzovať a interpretovať údaje o väzbe na hrER. V predchádzajúcich štúdiách sa vyskytli prípady, pri ktorých mohol analýzu a interpretáciu údajov o kompetitívnej väzbe na receptor skomplikovať nárast percentuálnej hodnoty špecifickej väzby počas testovania chemikálií pri najvyšších koncentráciách (obrázok 2). Ide o známy problém, ktorý sa vyskytol pri používaní protokolov vo viacerých receptorových testoch s kompetitívnou väzbou ((3). V týchto prípadoch sa pri nižších koncentráciách pozoruje reakcia závislá od koncentrácie, keď sa však koncentrácia testovanej chemikálie priblíži limitu rozpustnosti, miera premiestnenia [^{3}H]17β-estradiolu prestane klesať. V takýchto prípadoch vyplýva z údajov pre vyššie koncentrácie, že sa dosiahla biologická hranica skúšky. Tento jav napríklad mnohokrát súvisí s nerozpustnosťou chemikálie a jej zrážaním pri vysokých koncentráciách alebo môže byť aj prejavom prekročenia kapacity uhlia povrchovo upraveného dextránom zachytiť neviazaný ligand označený rádioizotopom počas postupu separácie pri najvyšších koncentráciách chemikálie. Keď sa takéto údajové body ponechajú pri zostrojení sigmoidnej krivky na základe údajov kompetitívnej väzby, môže to niekedy viesť k nesprávnej klasifikácii potenciálu testovanej chemikálie z hľadiska viazania sa na ER (obrázok 2). Na to, aby sa tomu predišlo, obsahuje protokol pre skúšky FW a CERI väzby na hrER možnosť vylúčiť z analýzy údajové body, pri ktorých stredná hodnota replikátov v prípade percentuálnej hranice špecifickej pre ^{3}H]17β-estradiol najmenej o 10 % presahuje pozorovanú strednú hodnotu pri nižšej koncentrácii (tento postup sa bežne označuje ako pravidlo 10 %). Pri danej krivke možno toto pravidlo použiť len raz, pričom najmenej pre šesť koncentrácií musia zostať také údaje, aby bolo možné krivku správne klasifikovať.

Obrázok 2

Príklady, krivky kompetitívnej väzby pri použití a bez použitia pravidla 10 %

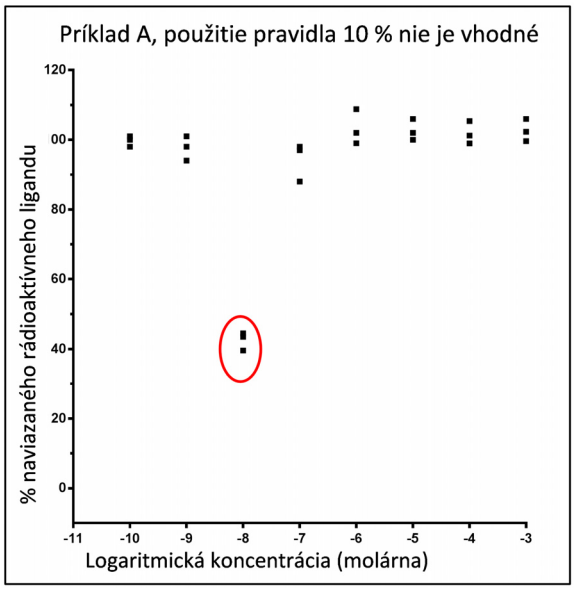


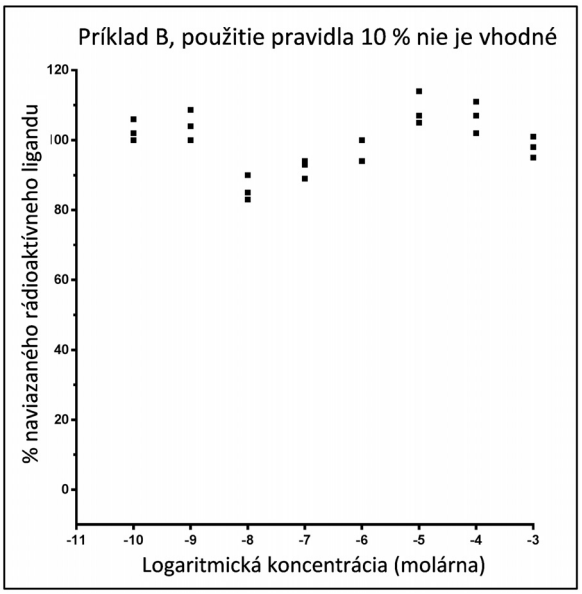
▼**M8**

5. Vhodné použitie pravidla 10 % je potrebné dôkladne zvážiť, pričom má byť vyhradené len pre prípady, ktoré výrazne naznačujú, že pôjde o látku vytvárajúcu väzbu na hrER. Počas vykonávania pokusov pre validačnú štúdiu skúšky FW väzby na hrER sa zistilo, že pri použití pravidla 10 % sa niekedy vyskytli nezamýšľané a nepredvídané dôsledky. V prípade chemikálií, pri ktorých nedochádzalo k interakcii s receptorom (t. j. skutočné látky nevytvárajúce väzbu), sa často prejavovala variabilita okolo 100 % väzby rádioaktívneho ligandu, ktorá bola vyššia ako 10 % v rámci rozsahu testovaných koncentrácií. Ak by sa stalo, že by sa najnižšia hodnota vyskytla pri nízkej koncentrácii, pomocou pravidla 10 % by sa z analýzy mohli potenciálne odstrániť údaje zo všetkých vyšších koncentrácií, hoci by tieto koncentrácie mohli byť užitočné pri stanovení toho, že daná chemikália predstavuje látku nevytvárajúcu väzbu. Na obrázku 3 sú znázornené príklady situácií, keď nie je vhodné použiť pravidlo 10 %.

Obrázok 3

Príklady, údaje kompetitívnej väzby, pri ktorých nie je vhodné použiť pravidlo 10 %





▼**M8**

Odkazy

(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, s. 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. SKÚŠKY KOŽNEJ SENZIBILIZÁCIE *IN VITRO* SO ZAMERANÍM NA KĽÚČOVÚ UDALOSŤ AKTIVÁCIE DENDRITOVÝCH BUNIEK V RÁMCI DRÁHY NEPRIAZNIVÉHO ÚČINKU (AOP) KOŽNEJ SENZIBILIZÁCIE

VŠEOBECNÝ ÚVOD

Testovacia metóda založená na kľúčovej udalosti aktivácie dendritových buniek

1. Pod kožným senzibilizátorom sa rozumie látka, ktorá pri kontakte s kožou vyvolá alergickú reakciu podľa definície v Globálnom harmonizovanom systéme klasifikácie a označovania chemických látok (GHS OSN) (1) a nariadení Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (CLP) ([1]). V prípade kľúčových biologických udalostí vedúcich ku kožnej senzibilizácii panuje všeobecná zhoda. Súčasné poznatky o chemických a biologických mechanizmoch, ktoré súvisia s kožnou senzibilizáciou, boli zhrnuté v rámci programu AOP OECD (2) ako dráha nepriaznivého účinku (AOP), ktorá sa začína molekulárnou iniciačnou udalosťou, pokračuje následnými udalosťami a napokon vedie k nežiaducemu účinku, t. j. alergickej kontaktnej dermatitíde. V tomto prípade je molekulárnou iniciačnou udalosťou (t. j. prvou kľúčovou udalosťou) vznik kovalentnej väzby elektrofilných látok s nukleofilnými jadrami kožných proteínov. K druhej kľúčovej udalosti v rámci tejto dráhy nepriaznivého účinku (AOP) dochádza v keratínocytoch, pričom udalosť zahŕňa zápalové reakcie, ako aj zmeny génovej expresie v súvislosti so špecifickými signálnymi dráhami bunky, akými sú dráhy závislé od úseku ARE („antioxidant/electrophile response element“). Treťou kľúčovou udalosťou je aktivácia dendritových buniek (DC), ktorá sa zvyčajne posudzuje podľa expresie špecifických povrchových bunkových markerov, chemokínov a cytokínov. Štvrtou kľúčovou udalosťou je aktivácia a proliferácia T-buniek, ktorá sa nepriamo posudzuje lokálnou skúškou lymfatických uzlín na myšiach a potkanoch (LLNA) (3).

2. Táto testovacia metóda (TM) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 442E (2017). Opisujú sa v nej skúšky *in vitro* v súvislosti s mechanizmami opísanými pri kľúčovej udalosti aktivácie dendritových buniek v rámci dráhy nepriaznivého účinku (AOP) kožnej senzibilizácie (2). Súčasťou tejto testovacej metódy sú testy, ktoré sa majú použiť na podporu rozlíšenia kožných senzibilizátorov od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu v súlade s GHS OSN a CLP.

   V tejto testovacej metóde sa opisujú tieto testy:

   — test aktivácie ľudskej bunkovej línie (h-CLAT),

   — test aktivácie bukovej línie U937 (U-SENS™),

   — skúška reportérového génu interleukínu-8 (skúška IL-8 Luc).

3. Testy, ktoré sú súčasťou tejto testovacej metódy a príslušného TG OECD, sa môžu líšiť z hľadiska postupu použitého na generovanie údajov a meraných hodnôt, možno ich však bez rozdielu použiť na riešenie požiadaviek štátov týkajúcich sa výsledkov testov v súvislosti s kľúčovou udalosťou aktivácie dendritových buniek v rámci dráhy nepriaznivého účinku (AOP) kožnej senzibilizácie, pričom sa v nich využíva vzájomné uznávanie údajov OECD.

([1]) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 z 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006, Ú. v. EÚ L 353/1, 31.12.2008.

▼M8

Súvislosti a zásady testov v rámci testovacej metódy na základe kľúčovej udalosti

4. Posudzovanie kožnej senzibilizácie obyčajne zahŕňalo použitie laboratórnych zvierat. Klasické metódy založené na použití morčiat, maximalizačný test na morčatách podľa Magnussona a Kligmana (GPMT) a Buehlerov test (TM B.6) (4), sú zamerané na posudzovanie indukčnej aj elicitačnej fázy kožnej senzibilizácie. Prijaté boli aj testy na myšiach a potkanoch, lokálna skúška lymfatických uzlín (LLNA) (TM B.42) (3)a jej dve nerádioaktívne modifikácie, LLNA: DA (TM B.50) (5) a LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51) (6), ktorými sa posudzuje výlučne indukčná reakcia, pretože sú vhodnejšie ako testy na morčatách tak z hľadiska dobrých životných podmienok zvierat, ako aj z hľadiska objektívneho merania indukčnej fázy kožnej senzibilizácie.

5. Nedávno boli prijaté testovacie metódy *in chemico* a *in vitro* založené na mechanistických poznatkoch, ktoré sa zameriavajú na prvú kľúčovú udalosť [TM B.59; skúška priamej peptidovej reaktivity (7)] a druhú kľúčovú udalosť [TM B.60; testovacia metóda „ARE-Nrf2 luciferáza“ (8)] AOP kožnej senzibilizácie, ktoré majú prispievať k posudzovaniu potenciál nebezpečnosti chemikálií z hľadiska kožnej senzibilizácie.

6. Pri testoch opísaných v tejto testovacej metóde sa kvantifikuje buď zmena expresie povrchových bunkových markerov súvisiacich s procesom aktivácie monocytov a dendritových buniek po expozícii senzibilizátorom (napr. CD54, CD86), alebo zmena expresie IL-8, cytokínu súvisiaceho s aktiváciou dendritových buniek. Existujú informácie o tom, že kožné senzibilizátory vyvolávajú expresiu bunkových membránových markerov ako CD40, CD54, CD80, CD83 a CD86 popri indukcii proinflamačných cytokínov, napr. IL-1β a TNF-α, a viacerých chemokínov vrátane IL-8 (CXCL8) a CCL3 (9) (10) (11) (12), ktoré súvisia s aktiváciou dendritových buniek (2).

7. Keďže však aktivácia dendritových buniek predstavuje len jednu kľúčovú udalosť AOP kožnej senzibilizácie (2) (13), informácie získané pomocou testov, v rámci ktorých sa merajú markery aktivácie dendritových buniek, nemusia byť dostatočné na stanovenie záveru, pokiaľ ide o existenciu alebo neexistenciu potenciálu chemikálií spôsobiť kožnú senzibilizáciu. Navrhuje sa preto, aby údaje získané pomocou testov opísaných v tejto testovacie metóde slúžili na podporu rozlíšenia kožných senzibilizátorov od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu (t. j. kategória 1 GHS OSN/CLP) pri použití v rámci integrovaných prístupov k testovaniu a hodnoteniu (IATA) spolu s inými relevantnými doplňujúcimi informáciami, napr. odvodenými zo skúšok *in vitro* so zameraním na iné kľúčové udalosti AOP kožnej senzibilizácie, ako aj z netestovacích metód vrátane prevzatých údajov odvodených z chemických analógov (13). Zverejnili sa príklady použitia údajov získaných z týchto testov v rámci definovaných prístupov (13), t. j. prístupov, ktoré sú štandardizované z hľadiska množiny použitých informačných zdrojov a postupov použitých pri týchto údajoch na odvodenie prognóz, pričom ich možno použiť ako užitočné prvky v rámci IATA.

8. Testy opísané v tejto testovacej metóde nemožno používať samostatne, a to ani pri zaraďovaní kožných senzibilizátorov do podkategórií 1A a 1B vymedzených v GHS OSN/CLP v prípade, že orgány uplatňujú tieto dve voliteľné podkategórie, a ani pri stanovení predpokladanej potencie na účely rozhodnutí v súvislosti s posudzovaním bezpečnosti. V závislosti od regulačného rámca však pozitívne výsledky získané na základe týchto metód možno samostatne použiť pri klasifikácii chemikálie ako patriacej do kategórie 1 GHS OSN/CLP.

▼M8

9. Pojem „testovaná chemikália“ sa v tejto testovacej metóde používa na označenie toho, čo sa testuje ([1]), a nesúvisí s použiteľnosťou testov na testovanie jednozložkových látok, viaczložkových látok a/alebo zmesí. V súvislosti s použiteľnosťou testov pri viaczložkových látkach/zmesiach sú v súčasnosti dostupné len obmedzené informácie (14) (15). Tieto testy sú napriek tomu technicky použiteľné aj na testovanie viaczložkových látok a zmesí. Pred použitím tejto testovacej metódy na zmesi s cieľom generovať údaje plánované na regulačné účely by sa však malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na tento účel, a ak áno, tak prečo ([2]). Takéto úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulatórna požiadavka na testovanie danej zmesi. Okrem toho by sa pri testovaní viaczložkových látok alebo zmesí mala zvážiť možná interferencia medzi cytotoxickými zložkami a pozorovanými reakciami.

LITERATÚRA

(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. K dispozícii na lokalite: 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. K dispozícii na lokalite:http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(201210/PART1&docLanguage=En).

(3) Kapitola B.42 tejto prílohy: Lokálna skúška lymfatických uzlín.

(4) Kapitola B.6 tejto prílohy: Podráždenie pokožky.

(5) Kapitola B.50 tejto prílohy: Senzibilizácia kože: lokálna skúška lymfatických uzlín: DA.

(6) Kapitola B.51 tejto prílohy: Senzibilizácia kože: lokálna skúška lymfatických uzlín: BrdU-ELISA.

(7) Kapitola B.59 tejto prílohy: Kožná senzibilizácia *in chemico*: skúška priamej peptidovej reaktivity (DPRA).

(8) Kapitola B.60 tejto prílohy: Kožná senzibilizácia *in vitro*: testovacia metóda „ARE-Nrf2 luciferáza“.

(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]) V júni 2013 sa na spoločnom zasadnutí OECD dospelo k dohode, že tam, kde je to možné, sa bude v nových a aktualizovaných usmerneniach OECD na vykonávanie testov na opis toho, čo sa testuje, jednotnejšie uplatňovať pojem „testovaná chemikália“.

([2]) Táto veta bola navrhnutá a schválená na zasadnutí WNT v apríli 2014.

▼**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. K dispozícii na lokalite: 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**

Dodatok 1

KOŽNÁ SENZIBILIZÁCIA IN VITRO: TEST AKTIVÁCIE ĽUDSKEJ BUNKOVEJ LÍNIE (H-CLAT)

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

1. V teste h-CLAT sa kvantifikujú zmeny expresie povrchových bunkových markerov v súvislosti s procesom aktivácie monocytov a dendritových buniek (DC) (t. j. CD86 a CD54) v bunkovej línii THP-1 ľudskej monocytovej leukémie po expozícii senzibilizátorom (1) (2). Namerané úrovne expresie povrchových bunkových markerov CD86 a CD54 následne slúžia ako ukazovateľ pri rozlišovaní medzi kožnými senzibilizátormi a látkami nespôsobujúcimi senzibilizáciu.

2. Test h-CLAT sa posudzoval v rámci validačnej štúdie koordinovanej referenčným laboratóriom Európskej únie pre alternatívy k testovaniu na zvieratách (EURL ECVAM) a v následnom nezávislom partnerskom preskúmaní zo strany vedeckého poradného výboru laboratória EURL ECVAM (ESAC). Na základe zváženia všetkých dostupných dôkazov a vstupov regulačných orgánov a zainteresovaných strán vydalo laboratórium EURL ECVAM odporúčanie (3), aby sa test h-CLAT používal na podporu rozlíšenia senzibilizátorov od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu v rámci IATA na účely klasifikácie a označovania nebezpečnosti. Príklady použitia údajov z testu h-CLAT v kombinácii s inými informáciami sú uvedené v literatúre (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

3. Preukázalo sa, že test h-CLAT je prenosný do laboratórií, ktoré majú skúsenosti s technikami týkajúcimi sa bunkových kultúr a s analýzou pomocou prietokovej cytometrie. Úroveň reprodukovateľnosti v prognózach, ktorú možno od tohto testu očakávať, je rádovo 80 % v rámci laboratória a medzi laboratóriami (3) (12). Z výsledkov získaných vo validačnej štúdii (13) a v iných uverejnených štúdiách (14) celkovo vyplýva, že v porovnaní s výsledkami LLNA presnosť pri odlišovaní kožných senzibilizátorov (t. j. kategória 1 GHS OSN/CLP) od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu predstavuje 85 % (N = 142) s citlivosťou 93 % (94/101) a so špecifickosťou 66 % (27/41) [na základe opakovanej analýzy uskutočnenej laboratóriom EURL ECVAM (12), v ktorej sa zohľadnili všetky existujúce údaje a nebrali sa do úvahy negatívne výsledky pre chemikálie s hodnotou log Kow vyššou než 3,5, ako sa opisuje v odseku 4]. Test h-CLAT s väčšou pravdepodobnosťou povedie k falošne negatívnym prognózam v prípade chemikálií, ktoré vykazujú nízku až miernu potenciu z hľadiska kožnej senzibilizácie (t. j. podkategória 1B GHS OSN/CLP), než v prípade chemikálií vykazujúcich vysokú potenciu z hľadiska kožnej senzibilizácie (t. j. podkategória 1A GHS OSN/CLP) (4) (13) (15). Celkovo z týchto informácií vyplýva, že metóda h-CLAT je užitočná a môže prispieť k zisteniu nebezpečnosti z hľadiska kožnej senzibilizácie. Uvedené hodnoty presnosti testu h-CLAT ako samostatného testu sú však len orientačné, keďže test sa má hodnotiť v kombinácii s inými zdrojmi informácií v kontexte IATA a v súlade s ustanoveniami odsekov 7 a 8 všeobecného úvodu. Okrem toho by sa pri hodnotení metód na zistenie kožnej senzibilizácie bez použitia zvierat malo zohľadniť to, že test LLNA ani iné testy na zvieratách nemusia v plnej miere odzrkadľovať situáciu u ľudí.

4. Na základe v súčasnosti dostupných údajov sa preukázalo, že metódu h-CLAT možno použiť v prípade testovaných chemikálií, ktoré predstavujú rôzne organické funkčné skupiny, majú rôzne mechanizmy reakcie, potenciu z hľadiska kožnej senzibilizácie (ako bolo stanovené v štúdiách *in vivo*) a rôzne fyzikálno-chemické vlastnosti (3) (14) (15). Metóda h-CLAT sa používa pri testovaní chemikálií, ktoré sú rozpustné alebo vytvárajú stabilné disperzie (t. j. koloid alebo suspenziu, v ktorej sa testovaná chemikália neusadí ani neoddelí od rozpúšťadla/nosiča do rôznych fáz) vo vhodnom rozpúšťadle/nosiči (pozri odsek 14). Pri testovaných chemikáliách s hodnotou log Kow vyššou než 3,5 je vyššia pravdepodobnosť vzniku falošne negatívnych výsledkov (14). Negatívne výsledky pre testované chemikálie s hodnotou log Kow vyššou než 3,5 sa preto nemajú brať do úvahy. Pozitívne výsledky získané v prípade testovaných chemikálií s hodnotou log

▼M8

Kow vyššou než 3,5 však možno použiť na podporu identifikácie testovanej chemikálie ako kožného senzibilizátora. Okrem toho môžu z dôvodu obmedzenej metabolickej kapacity použitej bunkovej línie (16) a experimentálnych podmienok vykazovať v teste h-CLAT negatívne výsledky aj pro-haptény (t. j. látky, ktoré musia byť aktivované enzymaticky, napríklad enzýmami P450) a pre-haptény (t. j. látky aktivované oxidáciou), zvlášť tie s pomalou oxidáciou (15). Fluorescenčné testované chemikálie možno hodnotiť pomocou testu h-CLAT (17), silné fluorescenčné testované chemikálie, ktoré emitujú svetlo na rovnakej vlnovej dĺžke ako fluoresceín-izotio-kyanát (FITC) alebo propídium-jodid (PI), však budú ovplyvňovať detekciu pomocou prietokovej cytometrie, a preto ich nemožno správne hodnotiť pomocou protilátok konjugovaných s FITC alebo pomocou PI. V takom prípade možno použiť iné protilátky označené fluorochrómom alebo iné markery cytotoxicity, pokiaľ sa preukázalo, že poskytujú podobné výsledky ako protilátky označené pomocou FITC (pozri odsek 24) alebo PI (pozri odsek 18), napr. testovaním látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 1.2. Vzhľadom na vyššie uvedené informácie je negatívne výsledky potrebné interpretovať v kontexte uvedených obmedzení a spoločne s inými zdrojmi informácií v rámci IATA. V prípade, že existujú dôkazy o nepoužiteľnosti metódy h-CLAT na iné špecifické kategórie testovaných chemikálií, by sa táto metóda nemala pri týchto špecifických kategóriách použiť.

5. Ako bolo opísané vyššie, metóda h-CLAT umožňuje rozlišovanie medzi kožnými senzibilizátormi a látkami nespôsobujúcimi senzibilizáciu. Môže však takisto potenciálne prispieť k posúdeniu potencie z hľadiska senzibilizácie (4) (5) (9), ak sa použije v rámci integrovaných prístupov ako IATA. Na to, aby bolo možné určiť, ako výsledky testu h-CLAT môžu prispieť k posudzovaniu tejto potencie, však bude potrebná ďalšia práca, pokiaľ možno založená na údajoch týkajúcich sa človeka.

6. Vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 1.1.

PRINCÍP TESTU

7. Metóda h-CLAT predstavuje skúšku *in vitro*, v ktorej sa kvantifikujú zmeny expresie povrchových bunkových markerov (t. j. CD86 a CD54) v bunkách THP-1 bunkovej línie ľudskej monocytovej leukémie po 24-hodinovej expozícii testovanej chemikálii. Tieto povrchové molekuly predstavujú typické markery aktivácie monocytových buniek THP-1 a môžu imitovať aktiváciu dendritových buniek, ktorá zohráva významnú úlohu pri prvotnej aktivácii T-buniek. Zmeny expresie povrchových markerov sa merajú pomocou prietokovej cytometrie po zafarbení buniek pomocou protilátok označených fluorochrómom. Súčasne sa uskutočňuje meranie cytotoxicity s cieľom posúdiť, či pri nižších ako cytotoxických koncentráciách takisto dochádza k zvýšeniu expresie povrchových markerov. Vypočíta sa relatívna intenzita fluorescencie povrchových markerov v porovnaní s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla/kontrolou s nosičom, ktorá sa použije v prognostickom modeli (pozri odsek 26) na podporu rozlíšenia senzibilizátorov od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu.

PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

8. Je potrebné, aby laboratóriá pred začatím bežného používania testu opísaného v tomto dodatku k testovacej metóde B.71 preukázali technickú spôsobilosť použitím 10 látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 1.2. Používatelia testu majú okrem toho viesť historickú databázu údajov vytvorených na základe kontrol reaktivity (pozri odsek 11) a pozitívnych kontrol a kontrol s aplikáciou rozpúšťadla/kontrol s nosičom (pozri odseky 20 – 22) a na základe týchto údajov potvrdiť, že sa v priebehu času zachováva reprodukovateľnosť testu v ich laboratóriu.

▼M8

POSTUP

9. Tento test je založený na protokole DB-ALM (DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation – databázová služba v súvislosti s alternatívnymi metódami k pokusom na zvieratách) č. 158 k testu h-CLAT (18), ktorý predstavuje protokol použitý pri validačnej štúdii koordinovanej laboratóriom EURL ECVAM. Tento protokol sa odporúča používať pri vykonávaní a používaní metódy h-CLAT v laboratóriu. Ďalej je uvedený opis hlavných zložiek a postupov testu h-CLAT, ktorý sa skladá z dvoch krokov: *skúška na stanovenie dávky* a *meranie expresie CD86/CD54*.

Príprava buniek

10. Na vykonanie metódy h-CLAT sa používa bunková línia THP-1 ľudskej monocytovej leukémie. Odporúča sa, aby sa bunky (TIB-202™) získali z riadne kvalifikovanej bunkovej banky, ako je napríklad bunková banka ATCC (American Type Culture Collection).

11. Bunky THP-1 sa kultivujú pri teplote 37°C v atmosfére s vyššou relatívnou vlhkosťou a 5 % CO_2 v rastovom médiu RPMI-1640 s pridaním 10 % bovinného fetálneho séra (FBS), 2-merkaptoetanolu s koncentráciou 0,05 mM, 100 jednotiek/ml penicilínu a 100 µg/ml streptomycínu. Je možné vyhnúť sa použitiu penicilínu a streptomycínu v rastovom médiu. V takom prípade však musia používatelia overiť, že neprítomnosť antibiotík v rastovom médiu nemá vplyv na výsledky, a to napríklad testovaním látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 1.2. S cieľom minimalizovať riziko kontaminácie je v každom prípade potrebné dodržiavať osvedčené postupy kultivácie buniek bez ohľadu na prítomnosť alebo neprítomnosť antibiotík v médiu na kultiváciu buniek. Bunky THP-1 sa štandardne nasadia každé 2 – 3 dni s hustotou 0,1 až 0,2 × 10^6 buniek/ml. Je potrebné ich udržiavať pri hustote 0,1 až 1,0 × 10^6 buniek/ml. Pred použitím na testovanie sa bunky kvalifikujú uskutočnením kontroly reaktivity. Kontrola reaktivity buniek sa má uskutočniť dva týždne po rozmrazení pomocou pozitívnych kontrol, 2,4-dinitrochlórbenzénu (DNCB) (č. CAS 97-00-7, čistota ≥ 99 %) a síranu nikelnatého ($NiSO_4$) (č. CAS 10101-97-0, čistota ≥ 99 %), a negatívnej kontroly, kyseliny mliečnej (LA) (č. CAS 50-21-5, čistota ≥ 85 %). DNCB aj $NiSO_4$ majú vyvolať pozitívnu reakciu povrchových bunkových markerov CD86 aj CD54 a LA má vyvolať negatívnu reakciu povrchových bunkových markerov CD86 aj CD54. V rámci skúšky sa použijú len bunky, ktoré vyhovejú pri kontrole reaktivity. Bunky možno po rozmrazení rozmnožovať až dva mesiace. Nemá sa prekročiť 30 pasáží. Kontrola reaktivity sa má uskutočniť podľa postupov opísaných v odsekoch 20 – 24.

12. Na účely testovania sa bunky THP-1 nasadia s hustotou 0,1 × 10^6 buniek/ml alebo 0,2 × 10^6 buniek/ml a predbežne sa kultivujú v kultivačných bankách 72 hodín, resp. 48 hodín. Dôležité je, aby hustota buniek v kultivačnej banke priamo po období predbežnej kultivácie bola v každom pokuse čo najrovnomernejšia (na základe jednej z dvoch podmienok predbežnej kultivácie opísaných vyššie), pretože hustota buniek v kultivačnej banke priamo po predbežnej kultivácii môže ovplyvňovať expresiu CD86/CD54 vyvolanú alergénmi (19). V deň testovania sa bunky zozbierané z kultivačnej banky resuspendujú pomocou čerstvého rastového média s koncentráciou 2 × 10^6 buniek/ml. Bunky sa ďalej rozdelia na 24-jamkovú platničku s plochým dnom (500 µl, 1 × 10^6 buniek/jamka) alebo na 96-jamkovú mikrotitračnú platničku s plochým dnom (80 µl, 1,6 × 10^5 buniek/jamka).

Skúška na stanovenie dávky

13. *Skúška na stanovenie dávky* sa uskutočňuje s cieľom stanoviť hodnotu CV75 predstavujúcu koncentráciu testovanej chemikálie, ktorá spôsobuje 75 % životaschopnosť buniek (CV) v porovnaní s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla/kontrolou s nosičom. Na základe hodnoty CV75 sa stanovuje koncentrácia testovaných chemikálií na meranie expresie *CD86/CD54* (pozri odseky 20 – 24).

▼M8

Príprava testovaných chemikálií a kontrolných látok

14. Testované chemikálie a kontrolné látky sa pripravujú v deň testovania. V prípade metódy h-CLAT sa testované chemikálie rozpustia alebo stabilne rozmiešajú (pozri aj odsek 4) vo fyziologickom roztoku alebo v rastovom médiu, ktoré predstavujú prvú možnosť pri výbere rozpúšťadla/nosiča, alebo v dimetylsulfoxide (DMSO, čistota ≥ 99 %), ktorý predstavuje druhú možnosť pri výbere rozpúšťadla/nosiča, ak testovaná chemikália nie je rozpustná ani nevytvára stabilnú disperziu v prvých dvoch rozpúšťadlách, a to s konečnými koncentráciami 100 mg/ml (vo fyziologickom roztoku alebo v rastovom médiu) alebo 500 mg/ml (v DMSO). Iné rozpúšťadlá/nosiče ako tie, ktoré sú opísané vyššie, možno použiť, ak sa uvedie dostatočné vedecké zdôvodnenie. Zohľadňuje sa aj stabilita testovanej chemikálie v konečnom rozpúšťadle/nosiči.

15. Vykonajú sa tieto kroky riedenia, pričom sa začne pri zásobnom roztoku testovanej chemikálie s koncentráciou 100 mg/ml (vo fyziologickom roztoku alebo v rastovom médiu) alebo 500 mg/ml (v DMSO):

— V prípade použitia fyziologického roztoku alebo rastového média ako rozpúšťadla/nosiča: Pripraví sa osem zásobných roztokov (osem koncentrácií) pomocou dvojnásobných sériových riedení s príslušným rozpúšťadlom/nosičom. Tieto zásobné roztoky sa ďalej 50-násobne zriedia do rastového média (pracovné roztoky). Ak najvyššia konečná koncentrácia na mikrotitračnej platničke predstavujúca 1 000 μg/ml nie je toxická, opätovne sa stanoví maximálna koncentrácia pomocou nového testu cytotoxicity. Konečná koncentrácia na mikrotitračnej platničke nemá prekročiť 5 000 μg/ml v prípade testovaných chemikálií, ktoré sú rozpustené alebo stabilne rozmiešané vo fyziologickom roztoku alebo v rastovom médiu.

— V prípade použitia DMSO ako rozpúšťadla/nosiča: Pripraví sa osem zásobných roztokov (osem koncentrácií) pomocou dvojnásobných sériových riedení s príslušným rozpúšťadlom/nosičom. Tieto zásobné roztoky sa ďalej 250-násobne zriedia do rastového média (pracovné roztoky). Konečná koncentrácia na mikrotitračnej platničke nemá prekročiť 1 000 μg/ml, aj keď táto koncentrácia nie je toxická.

Pracovné roztoky sa nakoniec použijú na expozíciu pridaním rovnakého objemu pracovného roztoku do objemu bunkovej suspenzie THP-1 na mikrotitračnej platničke (pozri aj odsek 17), aby sa dosiahlo ďalšie dvojnásobné riedenie (konečný rozsah koncentrácií na mikrotitračnej platničke je zvyčajne 7,81 – 1 000 μg/ml).

16. V metóde h-CLAT sa ako kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom používa rastové médium [v prípade testovaných chemikálií rozpustených alebo stabilne rozmiešaných (pozri odsek 4) v rastovom médiu alebo vo fyziologickom roztoku] alebo DMSO (v prípade testovaných chemikálií rozpustených alebo stabilne rozmiešaných v DMSO), ktoré sa na mikrotitračnej platničke testuje v jednej konečnej koncentrácii 0,2 %. Riedi sa rovnakým spôsobom, ako je opísané pri pracovných roztokoch v odseku 15.

Aplikácia testovaných chemikálií a kontrolných látok

17. Rastové médium alebo pracovné roztoky opísané v odsekoch 15 a 16 sa zmiešajú v objemovom pomere 1:1 s bunkovými suspenziami pripravenými na 24-jamkovej alebo 96-jamkovej platničke s plochým dnom (pozri odsek 12). Ošetrené platničky sa potom inkubujú 24 ±0,5 hod. pri teplote 37°C a v atmosfére s obsahom 5 % CO_2. Treba dbať na to, aby sa zabránilo vyparovaniu prchavých testovaných chemikálií a krížovej kontaminácii testovanými chemikáliami medzi jamkami, napr. hermetickým uzatvorením platničky pred inkubáciou s testovanými chemikáliami (20).

▼M8

Farbenie pomocou propídium-jodidu (PI)

18. Po expozícii v trvaní 24 ±0,5 hod. sa bunky prenesú do vzorkových skúmaviek a vykoná sa ich odber pomocou centrifugácie. Supernatanty sa odstránia a zvyšné bunky sa resuspendujú pomocou 200 µl (v prípade použitia 96 jamiek) alebo 600 µl (v prípade použitia 24 jamiek) fosfátového tlmivého fyziologického roztoku obsahujúceho 0,1 % bovinného sérového albumínu (vyfarbovací tlmivý roztok). 200 µl bunkovej suspenzie sa prenesie do 96-jamkovej mikrotitračnej platničky s okrúhlym dnom (v prípade použitia 96 jamiek) alebo do mikroskúmavky (v prípade použitia 24 jamiek) a dvakrát sa premyje pomocou 200 µl (v prípade použitia 96 jamiek) alebo 600 µl (v prípade použitia 24 jamiek) vyfarbovacieho tlmivého roztoku. Nakoniec sa bunky resuspendujú vo vyfarbovacom tlmivom roztoku (napr. 400 µl) a pridá sa roztok PI (napr. 20 µl) (konečná koncentrácia PI je napríklad 0,625 µg/ml). Možno použiť iné markery cytotoxicity, ako je 7-aminoaktinomycín D (7-AAD), trypánová modrá alebo iné látky, ak pri alternatívnych farbivách možno preukázať, že poskytujú podobné výsledky ako PI, napríklad pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 1.2.

Meranie cytotoxicity pomocou prietokovej cytometrie a odhad hodnoty CV75

19. Príjem PI sa analyzuje pomocou prietokovej cytometrie s akvizičným kanálom FL-3. Vyžaduje sa celkový počet 10 000 živých buniek (bez prítomnosti PI). Životaschopnosť buniek možno vypočítať v analytickom programe cytometra pomocou rovnice uvedenej ďalej. V prípade nízkej životaschopnosti buniek je potrebné získať až 30 000 buniek vrátane mŕtvych buniek. Údaje možno prípadne získať počas jednej minúty po začatí analýzy.

$$Životaschopnosť\ buniek = \frac{Počet\ živých\ buniek}{Celkový\ počet\ získaných\ buniek} \times 100$$

Hodnota CV75 (pozri odsek 13), t. j. koncentrácia, pri ktorej sa prejavuje 75 % prežitie buniek THP-1 (25 % cytotoxicita), sa vypočíta pomocou logaritmickej lineárnej interpolácie podľa tejto rovnice:

$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

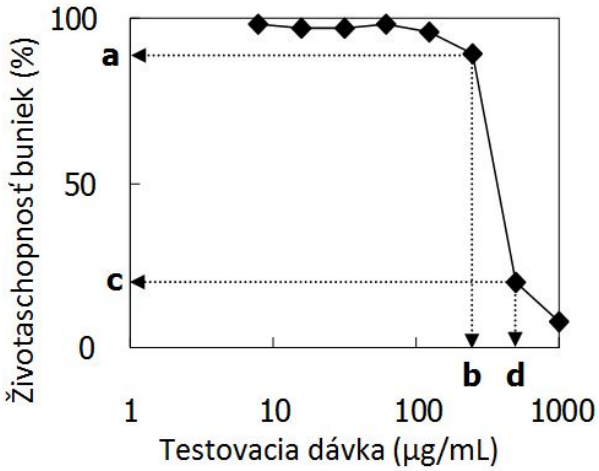
Keď:

a je minimálna hodnota životaschopnosti buniek nad 75 %

c je maximálna hodnota životaschopnosti buniek pod 75 %

b a d sú koncentrácie, pri ktorých sa prejavuje hodnota životaschopnosti buniek a, resp. c

▼M8



Na odvodenie hodnoty CV75 možno použiť aj iné prístupy, pokiaľ sa preukáže, že to nemá vplyv na výsledky (napr. pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti).

Meranie expresie CD86/CD54

Príprava testovaných chemikálií a kontrolných látok

20. Na rozpustenie alebo stabilné rozmiešanie testovaných chemikálií sa používa vhodné rozpúšťadlo/nosič (fyziologický roztok, rastové médium alebo DMSO; pozri bod 14). Testované chemikálie sa najskôr zriedia na koncentráciu, ktorá zodpovedá 100-násobku (v prípade fyziologického roztoku alebo rastového média) alebo 500-násobku (v prípade DMSO) hodnoty 1,2 × CV75 stanovenej v *skúške na stanovenie dávky* (pozri odsek 19). Ak hodnotu CV75 nemožno určiť (t. j. v *skúške na stanovenie dávky* sa nepozoruje dostatočná toxicita), ako počiatočná koncentrácia sa použije najvyššia rozpustná alebo stabilne rozmiešaná koncentrácia testovanej chemikálie pripravená pomocou jednotlivého rozpúšťadla/nosiča. Konečná koncentrácia na mikrotitračnej platničke nemá prekročiť 5 000 µg/ml (v prípade fyziologického roztoku alebo rastového média) alebo 1 000 µg/ml (v prípade DMSO). Ďalej sa pomocou príslušného rozpúšťadla/nosiča uskutočnia 1,2-násobné sériové riedenia, aby sa získali zásobné roztoky [osem koncentrácií v rozsahu od 100 × 1,2 × CV75 do 100 × 0,335 × CV75 (v prípade fyziologického roztoku alebo rastového média) alebo od 500 × 1,2 × CV75 do 500 × 0,335 × CV75 (v prípade DMSO)], ktoré sa budú testovať v rámci metódy h-CLAT (pozri príklad schémy dávkovania v protokole DB-ALM č. 158). Tieto zásobné roztoky sa ďalej 50-násobne (v prípade fyziologického roztoku alebo rastového média) alebo 250-násobne (v prípade DMSO) zriedia do rastového média (pracovné roztoky). Tieto pracovné roztoky sa nakoniec použijú na expozíciu s použitím ďalšieho faktora na konečné dvojnásobné riedenie na mikrotitračnej platničke. Ak výsledky nevyhovujú kritériám prijateľnosti opísaným v odsekoch 29 a 30 v súvislosti so životaschopnosťou buniek, môže sa zopakovať *skúška na stanovenie dávky* s cieľom určiť presnejšiu hodnotu CV75. Na meranie expresie CD86/CD54 možno použiť len 24-jamkové platničky.

21. Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom sa pripraví podľa opisu v odseku 16. Ako pozitívna kontrola sa pri metóde h-CLAT používa DNCB (pozri odsek 11), pričom sa pripravia zásobné roztoky v DMSO a zriedia sa podľa opisu pre zásobné roztoky v odseku 20. DNCB sa použije na platničke ako pozitívna kontrola na *meranie expresie CD86/CD54* v jednej konečnej koncentrácii (zvyčajne 4,0 µg/ml). Na získanie koncentrácie 4,0 µg/ml DNCB na platničke sa pripraví zásobný roztok 2 mg/ml DNCB v DMSO a ďalej sa 250-násobne zriedi s rastovým médiom na pracovný roztok s koncentráciou

▼M8

8 µg/ml. Prípadne možno ako koncentráciu pozitívnej kontroly použiť hodnotu CV75 DNCB, ktorá sa stanovuje v každom testovacom zariadení. Použiť možno iné vhodné pozitívne kontroly, ak sú k dispozícii historické údaje na odvodenie kritérií prijateľnosti porovnateľných testovacích cyklov. V prípade pozitívnych kontrol nemá daná jedna konečná koncentrácia na mikrotitračnej platničke prekročiť 5 000 µg/ml (v prípade fyziologického roztoku alebo rastového média) alebo 1 000 µg/ml (v prípade DMSO). Kritériá prijateľnosti testovacieho cyklu sú rovnaké ako kritériá prijateľnosti opísané pre testovanú chemikáliu (pozri odsek 29) okrem posledného kritéria prijateľnosti, keďže sa pozitívna kontrola testuje v jednej koncentrácii.

Aplikácia testovaných chemikálií a kontrolných látok

22. Pre každú testovanú chemikáliu a kontrolnú látku sa na získanie prognózy vyžaduje jeden pokus. Súčasťou každého pokusu sú najmenej dva nezávislé testovacie cykly na účely *merania expresie CD86/CD54* (pozri odseky 26 – 28). Jednotlivé nezávislé testovacie cykly sa uskutočnia v rôznych dňoch alebo v ten istý deň za predpokladu, že sa pre každý testovací cyklus: a) pripravia nezávislé čerstvé zásobné roztoky a pracovné roztoky testovanej chemikálie a roztoky s protilátkami a b) použijú sa nezávisle odobraté bunky (t. j. bunky sa odoberú z rôznych kultivačných baniek); bunky však môžu pochádzať z rovnakej pasáže. Testované chemikálie a kontrolné látky pripravené ako pracovné roztoky (500 µl) sa zmiešajú s 500 µl suspendovaných buniek (1×10^6 buniek) v pomere 1:1 a bunky sa inkubujú 24 ±0,5 hod. podľa opisu v odsekoch 20 a 21. V každom testovacom cykle je postačujúci jeden replikát každej koncentrácie testovanej chemikálie a kontrolnej látky, pretože sa prognóza stanovuje najmenej na základe dvoch nezávislých testovacích cyklov.

Farbenie buniek a analýza

23. Po expozícii v trvaní 24 ±0,5 hod. sa bunky prenesú z 24-jamkovej platničky do vzorkových skúmaviek, vykoná sa ich odber pomocou centrifugácie a potom sa dvakrát premyjú pomocou 1 ml vyfarbovacieho tlmivého roztoku (v prípade potreby možno uskutočniť ďalšie kroky premytia). Pre premytí sa uskutoční blokovanie buniek pomocou 600 µl blokujúceho roztoku [vyfarbovací tlmivý roztok s obsahom globulínu s koncentráciou 0,01 % (hm./obj.) (Cohnova frakcia II, III, ľudská; SIGMA, č. G2388-10G alebo ekvivalent)] a bunky sa 15 minút inkubujú pri teplote 4°C. Po blokovaní sa bunky rozdelia na tri alikvoty s objemom 180 µl do 96-jamkovej mikrotitračnej platničky alebo mikroskúmavky.

24. Po centrifugácii sa bunky zafarbia pomocou 50 µl anti-CD86 protilátok, anti-CD54 protilátok alebo myších protilátok (izotypu) IgG1 označených pomocou FITC pri teplote 4°C počas 30 min. Protilátky opísané v protokole DB-ALM č. 158 (18) k testu h-CLAT sa majú použiť zriedené v objemovom pomere 3:25 [pre CD86 (BD-PharMingen, č. 5556 57; klon: Fun-1)] alebo v objemovom pomere 3:50 [pre CD54 (DAKO, č. F7143; klon: 6.5B5) a IgG1 (DAKO, č. X0927)] s vyfarbovacím tlmivým roztokom. Tvorcovia testu vymedzili tieto faktory riedenia protilátok na základe toho, že poskytujú najlepší pomer signál-šum. Zo skúseností tvorcov testu vyplýva, že intenzita fluorescencie protilátok je medzi rôznymi šaržami zvyčajne jednotná. Používatelia však môžu zvážiť titráciu protilátok v podmienkach vlastného laboratória s cieľom stanoviť najvhodnejšie koncentrácie, ktoré sa majú použiť. Iné anti-CD86 a/alebo anti-CD54 protilátky označené fluorochrómom možno použiť, ak pri nich možno preukázať, že poskytujú podobné výsledky ako protilátky konjugované s FITC, napríklad pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 1.2. Je potrebné poznamenať, že výsledky môže ovplyvniť zmena klonu alebo dodávateľa protilátok, ako sa opisuje v protokole DB-ALM č. 158 (18) k testu h-CLAT. Po dvojnásobnom alebo viacnásobnom premytí pomocou 150 µl vyfarbovacieho tlmivého

▼M8

roztoku sa bunky resuspendujú vo vyfarbovacom tlmivom roztoku (napr. 400 µl) a pridá sa roztok PI (napr. 20 µl na dosiahnutie konečnej koncentrácie 0,625 µg/ml) alebo iný roztok markera cytotoxicity (pozri odsek 18). Pomocou prietokovej cytometrie sa analyzujú úrovne expresie CD86 a CD54, ako aj životaschopnosť buniek.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Hodnotenie údajov

25. Expresia CD86 a CD54 sa analyzuje pomocou prietokovej cytometrie s akvizičným kanálom FL-1. Na základe geometrického priemeru intenzity fluorescencie (MFI) sa relatívna intenzita fluorescencie (RFI) CD86 a CD54 pre bunky pozitívnej kontroly a bunky ošetrené chemikáliou vypočíta podľa tohto vzorca:

$$RFI = \frac{MFI\ buniek\ ošetrených\ chemikáliou - MFI\ buniek\ vizotypovej\ kontrole\ ošetrených\ chemikáliou}{MFI\ kontr.buniek\ ošetrených\ rozpúšťadlom/nosičom - FI\ buniek\ viz.kon.ošetrených\ rozp./nos.} \times 100$$

Životaschopnosť buniek dosiahnutá pri bunkách v izotypovej kontrole (ctrl) [ktoré sú zafarbené pomocou myších protilátok (izotypu) IgG1] sa takisto vypočíta podľa vzorca opísaného v odseku 19.

Prognostický model

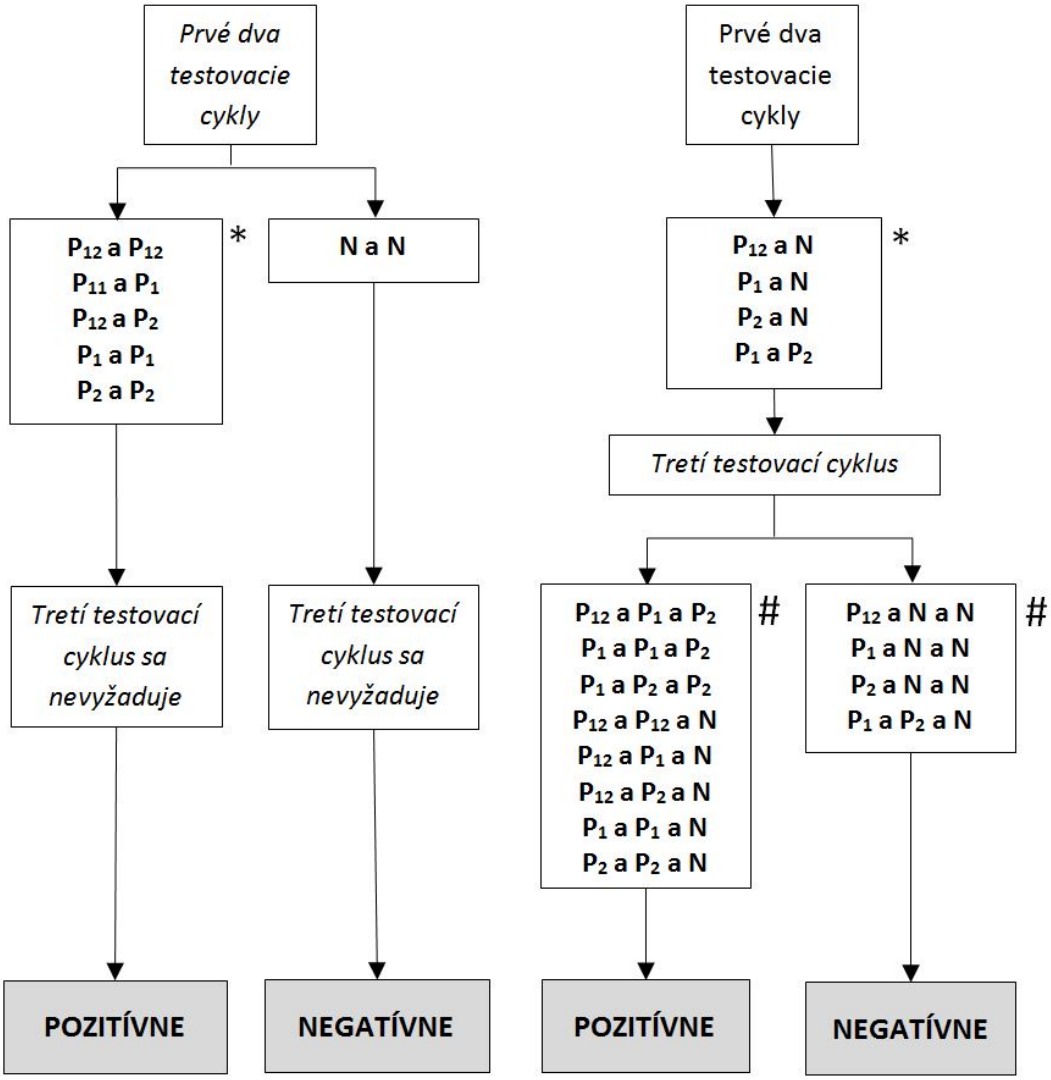
26. Na účely merania expresie *CD86/CD54* sa každá testovaná chemikália testuje najmenej v dvoch nezávislých testovacích cykloch, aby sa odvodila jedna prognóza (POZITÍVNA alebo NEGATÍVNA). Prognóza v teste h-CLAT sa považuje za POZITÍVNU, ak je splnená aspoň jedna z týchto podmienok v 2 z 2 alebo aspoň v 2 z 3 nezávislých testovacích cyklov, inak sa prognóza v teste h-CLAT považuje za NEGATÍVNU (obrázok 1):

— hodnota RFI pre CD86 je rovnaká alebo vyššia než 150 % pri každej testovanej koncentrácii (so životaschopnosťou buniek ≥ 50 %),

— hodnota RFI pre CD54 je rovnaká alebo vyššia než 200 % pri každej testovanej koncentrácii (so životaschopnosťou buniek ≥ 50 %).

27. Na základe uvedených informácií platí, že ak sú oba prvé dva testovacie cykly pozitívne v prípade CD86 a/alebo sú oba pozitívne v prípade CD54, prognóza v teste h-CLAT sa považuje za POZITÍVNU a tretí testovací cyklus nie je potrebné uskutočniť. Podobne, ak sú prvé dva testovacie cykly negatívne pre oba markery, prognóza v teste h-CLAT sa považuje za NEGATÍVNU (s prihliadnutím na ustanovenia odseku 30) bez toho, aby bolo potrebné uskutočniť tretí testovací cyklus. Ak však prvé dva testovacie cykly nie sú zhodné aspoň pre jeden z markerov (CD54 alebo CD86), vyžaduje sa tretí testovací cyklus a konečná prognóza bude založená na väčšinovom výsledku z troch jednotlivých testovacích cyklov (t. j. 2 z 3). V tejto súvislosti je potrebné poznamenať, že ak sa uskutočnia dva nezávislé testovacie cykly a jeden z nich je pozitívny len pre CD86 (ďalej len „P_1“) a druhý je pozitívny len pre CD54 (ďalej len „P_2“), vyžaduje sa tretí testovací cyklus. Ak je tento tretí testovací cyklus negatívny pre oba markery (ďalej len „N“), prognóza v teste h-CLAT sa považuje za NEGATÍVNU. Na druhej strane, ak je tretí testovací cyklus pozitívny pre jeden z markerov (P_1 alebo P_2) alebo pre oba markery (ďalej len „P_{12}“), prognóza v teste h-CLAT sa považuje za POZITÍVNU.

▼**M8**



Obrázok 1 Prognostický model použitý v metóde h-CLAT Prognóza v teste h-CLAT by sa mala posudzovať v rámci IATA a v súlade s ustanoveniami odsekov 7 a 8 všeobecného úvodu.

P_1: testovací cyklus s pozitívnym výsledkom len pre CD86; P_2: testovací cyklus s pozitívnym výsledkom len pre CD54; P_{12}: testovací cyklus s pozitívnym výsledkom pre CD86 aj CD54; N: testovací cyklus, ktorý nie je pozitívny pre CD86 ani pre CD54.

*V políčkach sa uvádzajú relevantné kombinácie výsledkov z prvých dvoch testovacích cyklov bez ohľadu na poradie, v akom sa mohli získať.

#V políčkach sa uvádzajú relevantné kombinácie výsledkov z troch testovacích cyklov na základe výsledkov získaných v prvých dvoch testovacích cykloch uvedených v predchádzajúcom políčku, neodrážajú však poradie, v akom sa mohli získať.

28. V prípade testovaných chemikálií, ktoré sú na základe prognózy v teste h-CLAT považované za POZITÍVNE, sa voliteľne môžu stanoviť dve hodnoty účinnej koncentrácie (EC), EC150 pre CD86, resp. EC200 pre CD54, čo je koncentrácia, pri ktorej testované chemikálie viedli k indukcii RFI s hodnotou 150 alebo 200. Tieto hodnoty EC môžu potenciálne prispieť k posúdeniu potencie z hľadiska senzibilizácie (9), ak sa použijú v rámci integrovaných prístupov ako IATA (4) (5) (6) (7) (8). Možno ich vypočítať pomocou týchto rovníc:

▼**M8**

$$EC150\ (pre\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC200\ (pre\ CD86) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

keď

A_{conc} je najnižšia koncentrácia v µg/ml s hodnotou RFI > 150 (CD86) alebo 200 (CD54)

B_{conc} je najvyššia koncentrácia v µg/ml s hodnotou RFI < 150 (CD86) alebo 200 (CD54)

A_{RFI} je hodnota RFI pri najnižšej koncentrácii s hodnotou RFI > 150 (CD86) alebo 200 (CD54)

B_{RFI} je hodnota RFI pri najvyššej koncentrácii s hodnotou RFI < 150 (CD86) alebo 200 (CD54)

Na účely presnejšieho odvodenia hodnôt EC150 a EC200 sa môžu vyžadovať tri nezávislé testovacie cykly *merania expresie CD86/CD54*. Konečné hodnoty EC150 a EC200 sa potom určia ako hodnota mediánu účinných koncentrácií (EC) vypočítaných z troch nezávislých testovacích cyklov. Keď kritériá pozitívnosti spĺňajú len dva z troch nezávislých testovacích cyklov (pozri odseky 26 – 27), použije sa vyššia hodnota EC150 alebo EC200 z dvoch vypočítaných hodnôt.

Kritériá prijateľnosti

29. Pri použití metódy h-CLAT majú byť splnené tieto kritériá prijateľnosti (22) (27).

— Hodnoty životaschopnosti buniek kontrol s rastovým médiom a kontrol s aplikáciou rozpúšťadla/kontrol s nosičom majú byť vyššie ako 90 %.

— Pri kontrole s aplikáciou rozpúšťadla/kontrole s nosičom nemajú hodnoty RFI pre CD86 ani pre CD54 prekročiť kritériá klasifikácie ako pozitívnej látky (RFI pre CD86 ≥ 150 % a RFI pre CD54 ≥ 200 %). Hodnoty RFI kontroly s aplikáciou rozpúšťadla/kontroly s nosičom sa vypočítajú pomocou vzorca opísaného v odseku 25 [výraz „MFI chemikálie“ sa nahrádza výrazom „MFI rozpúšťadla/nosiča“ a výraz „MFI rozpúšťadla/nosiča“ sa nahrádza výrazom „MFI kontroly (s rastovým médiom)“].

— Pre kontroly s rastovým médiom aj kontroly s aplikáciou rozpúšťadla/kontroly s nosičom má byť pomer MFI pre CD86 aj pre CD54 voči izotypovej kontrole > 105 %.

— V pozitívnej kontrole (DNCB) majú hodnoty RFI pre CD86 aj CD54 spĺňať kritériá klasifikácie ako pozitívnej látky (RFI pre CD86 ≥ 150 a RFI pre CD54 ≥ 200) a životaschopnosť buniek má byť vyššia ako 50 %.

— V prípade testovanej chemikálie má byť životaschopnosť buniek vyššia ako 50 % najmenej v štyroch testovaných koncentráciách v každom testovacom cykle.

30. Negatívne výsledky sú prijateľné len pri testovaných chemikáliách, pri ktorých sa prejavuje životaschopnosť buniek nižšia ako 90 % pri najvyššej testovanej koncentrácii (t. j. 1,2 × CV75 podľa schémy sériového riedenia opísanej v odseku 20). Ak je životaschopnosť buniek pri koncentrácii 1,2 × CV75 rovnaká alebo vyššia ako 90 %, tento negatívny výsledok sa vyradí. V takom prípade sa odporúča spresniť výber dávky opakovaným stanovením hodnoty CV75. Je potrebné poznamenať, že keď sa ako maximálna testovaná koncentrácia testovanej chemikálie použije 5 000 µg/ml vo fyziologickom roztoku (alebo v rastovom médiu či iných rozpúšťadlách/nosičoch), 1 000 µg/ml v DMSO alebo najvyššia rozpustná koncentrácia, negatívny výsledok je prijateľný, aj keď je životaschopnosť buniek vyššia ako 90 %.

▼**M8**

Správa o teste

31. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália

Jednozložkové látky

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— fyzický vzhľad, log Kow, rozpustnosť vo vode, rozpustnosť v DMSO, molekulová hmotnosť a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,

— testované koncentrácie,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi

— čo najpodrobnejšia charakterizácia, napr. prostredníctvom chemickej identity (pozri vyššie), čistoty, kvantitatívneho výskytu a relevantných fyzikálno-chemických vlastností (pozri vyššie) zložiek v dostupnom rozsahu,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode, rozpustnosť v DMSO a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu,

— molekulová hmotnosť alebo relatívna molekulová hmotnosť v prípade zmesí/polymérov známeho zloženia alebo iné informácie potrebné na vykonanie štúdie,

— úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,

— testované koncentrácie,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu.

Kontroly

Pozitívna kontrola

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— fyzický vzhľad, log K_{ow}, rozpustnosť vo vode, rozpustnosť v DMSO, molekulová hmotnosť a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu a podľa potreby,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

▼**M8**

— úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,

— testované koncentrácie,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— v uplatniteľnom prípade odkaz na historické výsledky pre pozitívne kontroly dokazujúce vhodné kritériá prijateľnosti testovacieho cyklu.

Negatívna kontrola a kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— fyzický vzhľad, molekulová hmotnosť a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v prípade, že sa použijú iné kontrolné rozpúšťadlá/nosiče ako tie uvedené v usmernení na vykonávanie testov, a to v dostupnom rozsahu,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu.

Podmienky testu

— meno a adresa objednávateľa, testovacieho zariadenia a vedúceho štúdie,

— opis použitého testu,

— použitá bunková línia, podmienky jej skladovania a zdroj (napr. zariadenie, z ktorého bola získaná),

— použitá prietoková cytometria (napr. model) vrátane použitých nastavení prístroja, globulínu, protilátok a markera cytotoxicity,

— postup použitý na preukázanie spôsobilosti laboratória vykonávať daný test testovaním chemikálií na preukázanie spôsobilosti a postup použitý na preukázanie opakovateľného vykonávania testu v priebehu času, napr. údaje o historických kontrolách a/alebo údaje o historických kontrolách reaktivity.

Kritériá prijateľnosti testu

— hodnoty životaschopnosti buniek, hodnoty MFI a RFI získané pomocou kontroly s aplikáciou rozpúšťadla/kontroly s nosičom v porovnaní s rozsahmi prijateľnosti,

— hodnoty životaschopnosti buniek a hodnoty RFI získané pomocou pozitívnej kontroly v porovnaní s rozsahmi prijateľnosti,

— životaschopnosť buniek pri všetkých testovaných koncentráciách testovanej chemikálie.

▼**M8**

Testovací postup

— počet použitých testovacích cyklov,

— použité koncentrácie testovaných chemikálií, ich použitie a expozičný čas (ak sa líšia od odporúčaných),

— opis použitých kritérií hodnotenia a rozhodovania,

— opis všetkých zmien v testovacom postupe.

Výsledky

— údaje v tabuľkovej podobe vrátane CV75 (v uplatniteľnom prípade), individuálnych geometrických priemerov MFI, RFI, hodnôt životaschopnosti buniek, hodnôt EC150/EC200 (v uplatniteľnom prípade) získaných pri testovanej chemikálii a pri pozitívnej kontrole v každom testovacom cykle, ako aj uvedenie hodnotenia testovanej chemikálie podľa prognostického modelu,

— v uplatniteľnom prípade opis všetkých relevantných pozorovaní.

Rozbor výsledkov

— rozbor výsledkov získaných metódou h-CLAT,

— posúdenie výsledkov testu v kontexte IATA, ak sú k dispozícii iné relevantné informácie.

Závery

LITERATÚRA

(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. K dispozícii na lokalite: 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). K dispozícii na lokalite: 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. K dispozícii na lokalite: 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), s. 23. K dispozícii na lokalite: 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, s. 96.

(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. K dispozícii na lokalite: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(201210/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. K dispozícii na lokalite: 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

Dodatok 1.1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: miera zhody výsledkov testu s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o mieru výkonnosti testu a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testu (21).

AOP (dráha nepriaznivého účinku): sled udalostí od chemickej štruktúry cieľovej chemikálie alebo skupiny podobných chemikálií cez molekulárnu iniciačnú udalosť až po výsledok *in vivo*, ktorý je predmetom záujmu (22).

Chemikália: látka alebo zmes.

CV75: odhadovaná koncentrácia, pri ktorej sa pozoruje 75 % životaschopnosť buniek.

EC150: koncentrácie, pri ktorých sa vykazujú hodnoty RFI 150 pri expresii CD86.

EC200: koncentrácie, pri ktorých sa vykazujú hodnoty RFI 200 pri expresii CD54.

Prietoková cytometria: cytometrická technika, pri ktorej bunky rozmiešané v kvapaline prechádzajú jednotlivo cez ohnisko excitovaného svetla, ktoré je rozptýlené podľa vzorov charakteristických pre bunky a ich zložky. Bunky sa často označujú pomocou fluorescenčných markerov, vďaka čomu sa svetlo najskôr absorbuje a následne emituje v zmenených frekvenciách.

Nebezpečnosť: inherentná vlastnosť činidla, prípadne situácia, ktorá môže vyvolať nepriaznivé účinky pri expozícii organizmu, systému alebo (sub)populácie účinkom daného činidla.

IATA (integrovaný prístup k testovaniu a hodnoteniu): štruktúrovaný prístup používaný na identifikáciu (potenciálnej) nebezpečnosti, charakterizáciu nebezpečnosti (z hľadiska potencie) a/alebo hodnotenie bezpečnosti (potenciál/potencia a expozícia) chemikálie alebo skupiny chemikálií, ktorý strategicky integruje a porovnáva všetky relevantné údaje v záujme prijatia regulačného rozhodnutia o potenciálnej nebezpečnosti a/alebo riziku a/alebo potrebe vykonania ďalších cielených, t. j. minimálnych testov.

Kontrola s rastovým médiom: neošetrený replikát, ktorý obsahuje všetky zložky testovacieho systému. Táto vzorka sa spracuje so vzorkami ošetrenými testovanou chemikáliou, ako aj s inými kontrolnými vzorkami s cieľom zistiť, či rozpúšťadlo/nosič a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Zmes: zmes alebo roztok zložený z dvoch alebo viacerých látok.

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej 80 hm. %.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii $\geq$ 10 hm. % a $<$ 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo k chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

▼M8

Pozitívna kontrola: replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému a ošetrený látkou, ktorá je známa tým, že vyvoláva pozitívnu reakciu. Aby bolo možné vyhodnotiť variabilitu reakcie na pozitívnu kontrolu v čase, nesmie byť rozsah pozitívnej reakcie nadmerne veľký.

Pre-haptény: chemikálie, ktoré sa stávajú senzibilizátormi prostredníctvom abiotickej transformácie.

Pro-haptény: chemikálie, pri ktorých sa vyžaduje enzymatická aktivácia na to, aby vznikol potenciál kožnej senzibilizácie.

Relatívna fluorescenčná intenzita (RFI): relatívne hodnoty geometrického priemeru intenzity fluorescencie (MFI) v bunkách ošetrených chemikáliou v porovnaní s hodnotou MFI pri bunkách ošetrených rozpúšťadlom/nosičom.

Relevantnosť: opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej sa testom správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testu (21).

Spoľahlivosť: miera rozsahu, v rámci ktorého sa môže test počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Hodnotí sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a vnútrolaboratórnej opakovateľnosti (21).

Testovací cyklus: testovací cyklus pozostáva z jednej alebo viacerých testovaných chemikálií testovaných súbežne s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla/kontrolou s nosičom a s pozitívnou kontrolou.

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testu, ktorý poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testu (21).

Vyfarbovací tlmivý roztok: fosfátový tlmivý fyziologický roztok obsahujúci 0,1 % bovinného sérového albumínu.

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom: neošetrená vzorka obsahujúca všetky zložky testovacieho systému okrem testovanej chemikálie, ale vrátane použitého rozpúšťadla/nosiča. Slúži na stanovenie základnej reakcie vzoriek ošetrených testovanou chemikáliou rozpustenou alebo stabilne rozmiešanou v rovnakom rozpúšťadle/nosiči. Keď sa táto vzorka testuje so súbežnou kontrolou s rastovým médiom, preukáže sa aj to, či rozpúšťadlo/nosič a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testu, ktorý poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testu (21).

Látka: chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie ich stability a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ktorý však nezahŕňa žiadne rozpúšťadlá, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo zmeny jej zloženia.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto metódy.

▼**M8**

Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií OSN (GHS OSN): systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálnej, zdravotnej a environmentálnej nebezpečnosti a ich označovanie zodpovedajúcimi komunikačnými prvkami, ako sú piktogramy, výstražné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o nepriaznivých účinkoch daných chemikálií v záujme ochrany osôb (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a subjektov reakcie na núdzové situácie) a životného prostredia (23).

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

Platný test: test, ktorý sa na daný účel považuje za dostatočne relevantný a spoľahlivý a ktorý je založený na vedecky podložených zásadách. Test nie je nikdy platný v absolútnom zmysle, ale len vo vzťahu k vymedzenému účelu (21).

▼**M8**

Dodatok 1.2

LÁTKY NA PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

Je potrebné, aby laboratóriá pred začatím bežného používania testu opísaného v tomto dodatku k testovacej metóde B.71 preukázali technickú spôsobilosť tak, že správne získajú očakávanú prognózu výsledku testu h-CLAT v prípade 10 chemikálií odporúčaných v tabuľke 1 a získajú hodnoty CV75, EC150 a EC200, ktoré patria do príslušného referenčného rozsahu pre najmenej 8 z 10 látok na preukázanie spôsobilosti. Látky na preukázanie spôsobilosti boli vybrané tak, aby reprezentovali rozsah reakcií z hľadiska nebezpečenstva kožnej senzibilizácie. Medzi ďalšie výberové kritériá patrilo to, aby boli látky komerčne dostupné a aby boli dostupné referenčné údaje *in vivo* s vysokou kvalitou, ako aj údaje *in vitro* s vysokou kvalitou vygenerované pomocou metódy h-CLAT. Pre metódu h-CLAT sú k dispozícii aj publikované referenčné údaje (3) (14).

Tabuľka 1

Odporúčané látky na preukazovanie technickej spôsobilosti pri metóde h-CLAT

Látky na preukázanie spôsobilosti	Registračné číslo CAS	Skupenstvo	Prognóza *in vivo* (1)	Referenčný rozsah CV75 v µg/ml (2)	Výsledky h-CLAT pre CD86 (referenčný rozsah EC150 v µg/ml) (2)	Výsledky h-CLAT pre CD54 (Referenčný rozsah EC200 v µg/ml) (2)
2,4-dinitrochlórbenzén	97-00-7	tuhé	senzibilizátor (extrémny)	2 – 12	pozitívne (0,5 – 10)	pozitívne (0,5 – 15)
4-fenyléndiamín	106-50-3	tuhé	senzibilizátor (silný)	5 – 95	pozitívne (< 40)	negatívne (> 1,5) (3)
síran nikelnatý	10101-97-0	tuhé	senzibilizátor (mierny)	30 – 500	pozitívne (< 100)	pozitívne (10 – 100)
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	tuhé	senzibilizátor (mierny)	30 – 400	negatívne (> 10) (3)	pozitívne (10 – 140)
R(+)-limonén	5989-27-5	kvapalné	senzibilizátor (slabý)	> 20	negatívne (> 5) (3)	pozitívne (< 250)
imidazolidinyl močovina	39236-46-9	tuhé	senzibilizátor (slabý)	25 – 100	pozitívne (20 – 90)	pozitívne (20 – 75)
izopropanol	67-63-0	kvapalné	nespôsobuje senzibilizáciu	> 5 000	negatívne (> 5 000)	negatívne (> 5 000)
glycerol	56-81-5	kvapalné	nespôsobuje senzibilizáciu	> 5 000	negatívne (> 5 000)	negatívne (> 5 000)
kyselina mliečna	50-21-5	kvapalné	nespôsobuje senzibilizáciu	1 500 – 5 000	negatívne (> 5 000)	negatívne (> 5 000)
kyselina 4-aminobenzoová	150-13-0	tuhé	nespôsobuje senzibilizáciu	> 1 000	negatívne (> 1 000)	negatívne (> 1 000)

Skratky: Registračné číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service)

(1) Prognóza nebezpečnosti (a potencie) *in vivo* na základe údajov LLNA (3) (14). Potencia *in vivo* je odvodená pomocou kritérií navrhnutých organizáciou ECETOC (24).

(2) Na základe historických pozorovaných hodnôt (13) (25).

(3) Historicky sa väčšina negatívnych výsledkov získala pre tento marker, a preto sa prevažne očakáva negatívny výsledok. Uvedený rozsah bol vymedzený na základe malého počtu historicky pozorovaných pozitívnych výsledkov. V prípade, že sa získa pozitívny výsledok, hodnota EC má byť v rámci uvádzaného referenčného rozsahu.

▼**M8**

Dodatok 2

KOŽNÁ SENZIBILIZÁCIA *IN VITRO*: TEST AKTIVÁCIE BUKOVEJ LÍNIE U937 (U-SENS™)

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

1. V teste U-SENS™ sa kvantifikuje zmena expresie povrchového bunkového markera v súvislosti s procesom aktivácie monocytov a dendritových buniek (DC) (t. j. CD86) v bunkovej línii U937 ľudského histiocytového lymfómu po expozícii senzibilizátorom (1). Namerané úrovne expresie povrchového bunkového markera CD86 v bunkovej línii U937 následne slúžia ako ukazovateľ pri rozlišovaní medzi kožnými senzibilizátormi a látkami nespôsobujúcimi senzibilizáciu.

2. Test U-SENS™ sa hodnotil v rámci validačnej štúdie (2) koordinovanej spoločnosťou L'Oreal a následne bol predmetom nezávislého partnerského preskúmania zo strany vedeckého poradného výboru (ESAC) referenčného laboratória Európskej únie pre alternatívy k testovaniu na zvieratách (EURL ECVAM) (3). Na základe zváženia všetkých dostupných dôkazov a vstupov regulačných orgánov a zainteresovaných strán vydalo laboratórium EURL ECVAM odporúčanie (4), aby sa test U-SENS™ používal na podporu rozlíšenia senzibilizátorov od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu v rámci IATA na účely klasifikácie a označovania nebezpečnosti. OECD sa v usmerňovacom dokumente o vykazovaní štruktúrovaných prístupov k integrácii údajov a k individuálnym zdrojom informácií, ktoré sa používajú v rámci IATA v prípade kožnej senzibilizácie, v súčasnosti venuje viacerým prípadovým štúdiám opisujúcim rôzne stratégie testovania a prognostické modely. Jeden z uvedených rôznych vymedzených prístupov je založený na skúške U-SENS (5). Príklady použitia údajov z testu U-SENS™ v kombinácii s inými informáciami vrátane historických údajov a existujúcich platných údajov o ľuďoch (6) sú uvedené v literatúre (4) (5) (7).

3. Preukázalo sa, že test U-SENS™ je prenosný do laboratórií, ktoré majú skúsenosti s technikami týkajúcimi sa bunkových kultúr a s analýzou pomocou prietokovej cytometrie. Úroveň reprodukovateľnosti v prognózach, ktorú možno od tohto testu očakávať, je rádovo 90 % v rámci laboratória a 84 % medzi laboratóriami (8). Z výsledkov získaných vo validačnej štúdii (8) a v iných uverejnených štúdiách (1) celkovo vyplýva, že v porovnaní s výsledkami LLNA presnosť pri odlišovaní kožných senzibilizátorov (t. j. kategória 1 GHS OSN/CLP) od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu predstavuje 86 % (N = 166) s citlivosťou 91 % (118/129) a so špecifickosťou 65 % (24/37). V porovnaní s výsledkami u ľudí presnosť pri odlišovaní kožných senzibilizátorov (t. j. kategória 1 GHS OSN/CLP) od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu predstavuje 77 % (N = 101) s citlivosťou 100 % (58/58) a so špecifickosťou 47 % (20/43). V porovnaní s LLNA povedie test U-SENS™ s väčšou pravdepodobnosťou k falošne negatívnym prognózam v prípade chemikálií, ktoré vykazujú nízku až miernu potenciu z hľadiska kožnej senzibilizácie (t. j. podkategória 1B GHS OSN/CLP), než v prípade chemikálií vykazujúcich vysokú potenciu z hľadiska kožnej senzibilizácie (t. j. podkategória 1A GHS OSN/CLP) (1) (8) (9). Celkovo z týchto informácií vyplýva, že test U-SENS™ je užitočný a môže prispieť k zisteniu nebezpečnosti z hľadiska kožnej senzibilizácie. Uvedené hodnoty presnosti testu U-SENS™ ako samostatného testu sú však len orientačné, keďže test sa má hodnotiť v kombinácii s inými zdrojmi informácií v kontexte IATA a v súlade s ustanoveniami odsekov 7 a 8 všeobecného úvodu. Okrem toho by sa pri hodnotení metód na zistenie kožnej senzibilizácie bez použitia zvierat malo zohľadniť to, že test LLNA ani iné testy na zvieratách nemusia v plnej miere odzrkadľovať situáciu u ľudí.

▼**M8**

4. Na základe v súčasnosti dostupných údajov sa preukázalo, že test U-SENS™ možno použiť v prípade testovaných chemikálií (vrátane zložiek kozmetických výrobkov, napr. konzervačných látok, povrchovo aktívnych látok, účinných látok, farbív), ktoré predstavujú rôzne organické funkčné skupiny, fyzikálno-chemické vlastnosti, potenciu z hľadiska kožnej senzibilizácie (na základe stanovenia v štúdiách *in vivo*) a spektrum mechanizmov reakcie, o ktorých je známe, že súvisia s kožnou senzibilizáciou (t. j. Michaelov akceptor, vznik Schiffových zásad, prvok sprostredkujúci prenos acylovej skupiny, nukleofilná bimolekulová substitúcia [SN2] alebo nukleofilná substitúcia na aromatickom jadre [SNAr]) (1) (8) (9) (10). Test U-SENS™ sa používa pri testovaní chemikálií, ktoré sú rozpustné alebo vytvárajú stabilné disperzie (t. j. koloid alebo suspenziu, v ktorej sa testovaná chemikália neusadí ani neoddelí od rozpúšťadla/nosiča do rôznych fáz) vo vhodnom rozpúšťadle/nosiči (pozri odsek 13). Pomocou testu U-SENS™ sa dosiahla správna prognóza v prípade chemikálií, ktoré sú v množine údajov uvádzané ako pre-haptény (t. j. látky aktivované oxidáciou) alebo pro-haptény (t. j. látky vyžadujúce enzymatickú aktiváciu, napríklad pomocou enzýmov P450) (1) (10). Látky spôsobujúce narušenie membrány môžu viesť k falošne pozitívnym výsledkom vzhľadom na nešpecifické zvýšenie expresie CD86, keďže 3 zo 7 falošne pozitívnych látok vzhľadom na referenčnú klasifikáciu *in vivo* boli povrchovo aktívne látky (1). Takéto pozitívne výsledky v prípade povrchovo aktívnych látok je potrebné posudzovať obozretne, zatiaľ čo negatívne výsledky v prípade povrchovo aktívnych látok možno použiť na podporu identifikácie testovanej chemikálie ako látky nespôsobujúcej senzibilizáciu. Fluorescenčné testované chemikálie možno hodnotiť pomocou testu U-SENS™ (1), silné fluorescenčné testované chemikálie, ktoré emitujú svetlo na rovnakej vlnovej dĺžke ako fluoresceín-izotio-kyanát (FITC) alebo propídium-jodid (PI), však budú ovplyvňovať detekciu pomocou prietokovej cytometrie, a preto ich nemožno správne hodnotiť pomocou protilátok konjugovaných s FITC (potenciálne falošne negatívny výsledok) alebo pomocou PI (nie je možné merať životaschopnosť). V takom prípade možno použiť iné protilátky označené fluorochrómom alebo iné markery cytotoxicity, pokiaľ sa preukázalo, že poskytujú rovnaké výsledky ako protilátky označené pomocou FITC alebo PI (pozri odsek 18), napr. testovaním látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2.2. Vzhľadom na vyššie uvedené informácie je potrebné interpretovať pozitívne výsledky v prípade povrchovo aktívnych látok a negatívne výsledky v prípade silných fluorescenčných testovaných chemikálií v kontexte uvedených obmedzení a spoločne s inými zdrojmi informácií v rámci IATA. V prípade, že existujú dôkazy o nepoužiteľnosti testu U-SENS™ na iné špecifické kategórie testovaných chemikálií, by sa tento test nemal pri týchto špecifických kategóriách použiť.

5. Ako bolo opísané vyššie, test U-SENS™ umožňuje rozlišovanie medzi kožnými senzibilizátormi a látkami nespôsobujúcimi senzibilizáciu. Môže však takisto potenciálne prispieť k posúdeniu potencie z hľadiska senzibilizácie, ak sa použije v rámci integrovaných prístupov ako IATA. Na to, aby bolo možné určiť, ako výsledky testu U-SENS™ môžu prispieť k posudzovaniu tejto potencie, však bude potrebná ďalšia práca, pokiaľ možno založená na údajoch týkajúcich sa človeka.

6. Vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 2.1.

PRINCÍP TESTU

7. Test U-SENS™ predstavuje skúšku *in vitro*, v ktorej sa kvantifikujú zmeny expresie povrchového bunkového markera CD86 v bunkách U937 bunkovej línie ľudského histiocytového lymfómu po expozícii testovanej chemikálii v trvaní 45 ±3 hod. Povrchový marker CD86 je jedným typickým markerom aktivácie U937. Je známe, že CD86 je kostimulačná molekula, ktorá môže imitovať monocytovú aktiváciu zohrávajúcu významnú úlohu pri prvotnej aktivácii T-buniek. Zmeny expresie povrchového bunkového markera CD86 sa merajú pomocou prietokovej cytometrie po zafarbení buniek zvyčajne pomocou protilátok označených fluoresceín-izotio-kyanátom (FITC). Súčasne sa uskutočňuje aj meranie cytotoxicity (napr. pomocou

▼M8

PI) s cieľom posúdiť, či pri nižších ako cytotoxických koncentráciách dochádza k zvýšeniu expresie povrchového bunkového markera CD86. Vypočíta sa stimulačný index (SI) povrchového bunkového markera CD86 v porovnaní s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla/kontrolou s nosičom, ktorý sa použije v prognostickom modeli (pozri odsek 19) na podporu rozlíšenia senzibilizátorov od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu.

PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

8. Je potrebné, aby laboratóriá pred začatím bežného používania testu opísaného v tomto dodatku k testovacej metóde B.71 preukázali technickú spôsobilosť použitím 10 látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2.2 v súlade so správnymi postupmi metód *in vitro* (11). Používatelia testu majú okrem toho viesť historickú databázu údajov vytvorených na základe kontrol reaktivity (pozri odsek 11) a pozitívnych kontrol a kontrol s aplikáciou rozpúšťadla/kontrol s nosičom (pozri odseky 15 – 16) a na základe týchto údajov potvrdiť, že sa v priebehu času zachováva reprodukovateľnosť testu v ich laboratóriu.

POSTUP

9. Tento test je založený na protokole DB-ALM (DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation – databázová služba v súvislosti s alternatívnymi metódami k pokusom na zvieratách) č. 183 k testu U-SENS™ (12). Pri zavádzaní a využívaní testu U-SENS™ v laboratóriu sa majú používať štandardné prevádzkové postupy (SOP). Na používanie testu U-SENS™ možno použiť automatizovaný systém, ak pri ňom možno preukázať, že poskytuje podobné výsledky, napríklad pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2.2. Ďalej je uvedený opis hlavných zložiek a postupov testu U-SENS™.

Príprava buniek

10. Na vykonanie testu U-SENS™ sa používa bunková línia U937 ľudského histiocytového lymfómu (13). Bunky (klon CRL1593.2) sa majú získať z riadne kvalifikovanej bunkovej banky, ako je napríklad bunková banka ATCC (American Type Culture Collection).

11. Bunky U937 sa kultivujú pri teplote 37 °C v atmosfére s vyššou relatívnou vlhkosťou a 5 % CO_2 v rastovom médiu RPMI-1 640 s pridaním 10 % fetálneho teľacieho séra (FCS), L-glutamínu s koncentráciou 2 mM, 100 jednotiek/ml penicilínu a 100 µg/ml streptomycínu (úplné rastové médium). Pasážovanie buniek U937 sa štandardne uskutočňuje každé 2 – 3 dni s hustotou 1,5, resp. 3×10^5 buniek/ml. Hustota buniek nemá prekročiť 2×10^6 buniek/ml a životaschopnosť buniek, ktorá sa meria na základe vylúčenia trypánovej modrej, má byť ≥ 90 % (nemá sa použiť pri prvej pasáži po rozmrazení). Pred použitím na testovanie sa každá šarža buniek, FCS alebo protilátok kvalifikuje uskutočnením kontroly reaktivity. Na kontrolu reaktivity buniek sa používa pozitívna kontrola, kyselina 2,4,6-trinitrobenzénsulfónová trihydrát: TNBS) (registračné číslo CAS 2 508-19-2, čistota ≥ 99 %), a negatívna kontrola, kyselina mliečna (LA) (registračné číslo CAS 50-21-5, čistota ≥ 85 %), a to aspoň jeden týždeň po rozmrazení. Na kontrolu reaktivity sa testuje šesť konečných koncentrácií pre každú z týchto dvoch kontrol (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml a LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). V prípade TNBS rozpustenej v úplnom rastovom médiu sa má pri CD86 dosiahnuť pozitívna reakcia a reakcia závislá od koncentrácie (napr. keď za pozitívnou koncentráciou, SI pre CD86 ≥ 150, nasleduje koncentrácia s rastúcou hodnotou SI pre CD86) a v prípade LA rozpustenej v úplnom rastovom médiu sa má pri CD86 dosiahnuť negatívna reakcia (pozri odsek 21). V rámci skúšky sa použije len tá šarža buniek, ktorá dvakrát vyhovela pri kontrole reaktivity. Bunky možno po rozmrazení rozmnožovať až sedem týždňov. Nemá sa prekročiť 21 pasáží. Kontrola reaktivity sa má uskutočniť podľa postupov opísaných v odsekoch 18 – 22.

▼M8

12. Na účely testovania sa bunky U937 nasadia s hustotou 3×10^5 buniek/ml alebo 6×10^5 buniek/ml a predbežne sa kultivujú v kultivačných bankách 2 dni, resp. 1 deň. Iné podmienky predbežnej kultivácie ako tie, ktoré sú opísané vyššie, možno použiť, ak sa uvedie dostatočné vedecké zdôvodnenie a ak pri nich možno preukázať, že poskytujú podobné výsledky, napríklad pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2.2. V deň testovania sa bunky zozbierané z kultivačnej banky resuspendujú pomocou čerstvého rastového média s koncentráciou 5×10^5 buniek/ml. Bunky sa ďalej rozdelia na 96-jamkovú mikrotitračnú platničku s plochým dnom po 100 µl (konečná hustota buniek $0{,}5 \times 10^5$ buniek/jamka).

Príprava testovaných chemikálií a kontrolných látok

13. Pred testovaním sa uskutoční posúdenie rozpustnosti. Na tento účel sa testované chemikálie rozpustia alebo stabilne rozmiešajú s koncentráciou 50 mg/ml v úplnom rastovom médiu, ktoré predstavuje prvú možnosť pri výbere rozpúšťadla, alebo v dimetylsulfoxide (DMSO, čistota ≥ 99 %), ktorý predstavuje druhú možnosť pri výbere rozpúšťadla/nosiča, ak testovaná chemikália nie je rozpustná v rozpúšťadle/nosiči s úplným rastovým médiom. Na účely tohto testovania sa testovaná chemikália rozpustí s konečnou koncentráciou 0,4 mg/ml v úplnom rastovom médiu, ak je chemikália rozpustná v tomto rozpúšťadle/nosiči. Ak je chemikália rozpustná len v DMSO, rozpustí sa s koncentráciou 50 mg/ml. Iné rozpúšťadlá/nosiče ako tie, ktoré sú opísané vyššie, možno použiť, ak sa uvedie dostatočné vedecké zdôvodnenie. Zohľadňuje sa aj stabilita testovanej chemikálie v konečnom rozpúšťadle/nosiči.

14. Testované chemikálie a kontrolné látky sa pripravujú v deň testovania. Keďže sa neuskutočňuje skúška na stanovenie dávky, v prvom testovacom cykle sa testuje 6 konečných koncentrácií (1, 10, 20, 50, 100 a 200 µg/ml) v príslušnom rozpúšťadle/nosiči, a to buď v úplnom rastovom médiu, alebo v 0,4 % DMSO v rastovom médiu. V nasledujúcich testovacích cykloch, pri ktorých sa začína s roztokmi testovanej chemikálie od koncentrácie 0,4 mg/ml v úplnom rastovom médiu alebo 50 mg/ml v DMSO, sa pripravia aspoň 4 pracovné roztoky (t. j. aspoň 4 koncentrácie) v príslušnom rozpúšťadle/nosiči. Pracovné roztoky sa nakoniec použijú na ošetrenie pridaním rovnakého objemu bunkovej suspenzie U937 (pozri odsek 11 vyššie) k objemu pracovného roztoku na mikrotitračnej platničke, aby sa dosiahlo ďalšie dvojnásobné riedenie (12). Koncentrácie (aspoň 4 koncentrácie) pre akýkoľvek ďalší testovací cyklus sa zvolia na základe jednotlivých výsledkov všetkých predchádzajúcich testovacích cyklov (8). Použiteľné konečné koncentrácie sú 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 a 200 µg/ml. Maximálna konečná koncentrácia je 200 µg/ml. V prípade, že sa pri CD86 pozoruje pozitívna hodnota pri koncentrácii 1 µg/ml, vyhodnotí sa koncentrácia 0,1 µg/ml s cieľom zistiť koncentráciu testovanej chemikálie, ktorá nespôsobuje indukciu CD86 nad hranicou pozitívnej klasifikácie. Pri každom testovacom cykle sa vypočíta hodnota EC150 (koncentrácia, pri ktorej sa pri chemikálii dosahuje hranica pozitívnej klasifikácie z hľadiska CD86 na úrovni 150 %, pozri odsek 19), ak sa pozoruje pozitívna reakcia v závislosti od koncentrácie v prípade CD86. V prípade, že testovaná chemikália vyvoláva pozitívnu reakciu CD86, ktorá nesúvisí s koncentráciou, výpočet hodnoty EC150 nemusí byť relevantný, ako sa opisuje v protokole DB-ALM č. 183 k testu U-SENS™ (12). Vždy, keď je to možné, sa pri každom testovacom cykle vypočíta hodnota CV70 (koncentrácia, pri ktorej sa pri chemikálii dosahuje hranica cytotoxicity na úrovni 70 %, pozri odsek 19) (12). S cieľom skúmať účinok zvýšenia CD86 z hľadiska závislosti od koncentrácie je potrebné zvoliť všetky koncentrácie spomedzi použiteľných koncentrácií tak, aby boli rovnomerne rozložené medzi hodnotou EC150 (alebo najvyššou negatívnou koncentráciou CD86, ktorá nie je cytotoxická) a hodnotou CV70 (alebo najvyššou povolenou koncentráciou, t. j. 200 µg/ml). V každom testovacom cykle sa majú testovať najmenej 4 koncentrácie, pričom na účely porovnania majú byť aspoň 2 koncentrácie spoločné s predchádzajúcimi testovacími cyklami.

▼M8

15. V teste U-SENS™ sa ako kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom používa úplné rastové médium (v prípade testovaných chemikálií, ktoré sú rozpustené alebo stabilne rozmiešané v úplnom rastovom médiu) (pozri odsek 4) alebo 0,4 % DMSO v úplnom rastovom médiu (v prípade testovaných chemikálií rozpustených alebo stabilne rozmiešaných v DMSO).

16. Ako pozitívna kontrola sa v teste U-SENS™ používa TNBS (pozri odsek 11) pripravená v úplnom rastovom médiu. TNBS sa použije na platničke ako pozitívna kontrola pre meranie expresie CD86 v jednej konečnej koncentrácii (50 µg/ml), pri ktorej sa dosahuje životaschopnosť buniek > 70 %. Na získanie koncentrácie 50 µg/ml TNBS na platničke sa pripraví zásobný roztok s koncentráciou 1 M (t. j. 293 mg/ml) TNBS v úplnom rastovom médiu a ďalej sa 2 930-násobne zriedi s úplným rastovým médiom na pracovný roztok s koncentráciou 100 µg/ml. Ako negatívna kontrola sa použije kyselina mliečna (LA, CAS 50-21-5) s koncentráciou 200 µg/ml, ktorá je rozpustená v úplnom rastovom médiu (zo zásobného roztoku s koncentráciou 0,4 mg/ml). Na každej platničke každého testovacieho cyklu sa pripravia tri replikáty neošetrenej kontroly s úplným rastovým médiom, kontroly s aplikáciou rozpúšťadla/kontroly s nosičom, negatívnych a pozitívnych kontrol (12). Použiť možno iné vhodné pozitívne kontroly, ak sú k dispozícii historické údaje na odvodenie kritérií prijateľnosti porovnateľných testovacích cyklov. Kritériá prijateľnosti testovacieho cyklu sú rovnaké ako kritériá prijateľnosti opísané pre testovanú chemikáliu (pozri odsek 12).

Aplikácia testovaných chemikálií a kontrolných látok

17. Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom alebo pracovné roztoky opísané v odsekoch 14 – 16 sa zmiešajú v objemovom pomere 1:1 s bunkovými suspenziami pripravenými na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke s plochým dnom (pozri odsek 12). Ošetrené platničky sa potom inkubujú 45 ±3 hod. pri teplote 37 °C a v atmosfére s obsahom 5 % CO_2. Pred inkubáciou sa mikrotitračné platničky uzatvoria polopriepustnou membránou, aby sa zabránilo vyparovaniu prchavých testovaných chemikálií a krížovej kontaminácii medzi jamkami ošetrenými testovanými chemikáliami (12).

Farbenie buniek

18. Po expozícii v trvaní 45 ±3 hod. sa bunky prenesú na mikrotitračnú platničku s kónickým dnom a vykoná sa ich odber pomocou centrifugácie. Interferencia z hľadiska rozpustnosti sa prejavuje vytvorením kryštálov alebo kvapiek, ktoré možno pozorovať pod mikroskopom 45 ±3 hod. po ošetrení (pred zafarbením buniek). Supernatanty sa odstránia a zvyšné bunky sa jedenkrát premyjú pomocou 100 µl ľadového fosfátového tlmivého fyziologického roztoku (PBS) s obsahom 5 % fetálneho teľacieho séra (vyfarbovací tlmivý roztok). Po centrifugácii sa bunky resuspendujú pomocou 100 µl vyfarbovacieho tlmivého roztoku a zafarbia sa pomocou 5 µl (napr. 0,25 µg) anti-CD86 protilátok alebo myších protilátok (izotypu) IgG1 označených pomocou FITC pri teplote 4 °C počas 30 min, pričom sú chránené pred svetlom. Použijú sa protilátky opísané v protokole DB-ALM č. 183 (12) k testu U-SENS™ (pre CD86: BD-PharMingen č. 5556 57, klon: Fun-1 alebo Caltag/Invitrogen č. MHCD8601, klon: BU63; a pre IgG1: BD-PharMingen č. 5557 48 alebo Caltag/Invitrogen č. GM4992). Zo skúseností tvorcov testu vyplýva, že intenzita fluorescencie protilátok je medzi rôznymi šaržami zvyčajne jednotná. V skúške možno použiť aj iné klony alebo protilátky od iného dodávateľa, ktoré vyhoveli pri kontrole reaktivity (pozri odsek 11). Používatelia však môžu zvážiť titráciu protilátok v podmienkach vlastného laboratória s cieľom stanoviť najvhodnejšiu koncentráciu, ktorá sa má použiť. Iný systém detekcie, napr. anti-CD86 protilátky označené fluorochrómom, možno použiť, ak pri nich možno preukázať, že poskytujú podobné výsledky ako protilátky konjugované s FITC, napríklad pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2.2. Bunky sa premyjú dvakrát pomocou 100 µl vyfarbovacieho tlmivého roztoku a jedenkrát pomocou 100 µl ľadového PBS a následne sa resuspendujú v ľadovom PBS (napr. 125 µl pri vzorkách, ktoré sa analyzujú manuálne po jednotlivých skúmavkách, alebo 50 µl pri použití platničky s automatickým dávkovačom) a pridá sa roztok PI (konečná

▼M8

koncentrácia 3 μg/ml). Možno použiť aj iné markery cytotoxicity, ako je 7-aminoaktinomycín D (7-AAD) alebo trypánová modrá, ak pri týchto alternatívnych farbivách možno preukázať, že poskytujú podobné výsledky ako PI, napríklad pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2.2.

Analýza pomocou prietokovej cytometrie

19. Pomocou prietokovej cytometrie sa analyzuje úroveň expresie CD86, ako aj životaschopnosť buniek. Bunky sa zobrazujú v rámci bodového grafu veľkosti (FSC) a granulácie (SSC) v logaritmickej mierke, aby bolo možné zreteľne identifikovať populáciu v prvej ohraničenej oblasti (gate) R1 a eliminovať úlomky buniek. V každej jamke sa vyžaduje dosiahnutie celkového cieľového počtu 10 000 buniek v ohraničenej oblasti R1. Bunky z rovnakej ohraničenej oblasti (gate) R1 sa zobrazujú v bodovom grafe FL3 alebo FL4/SSC. Životaschopné bunky sa vymedzia označením druhej ohraničenej oblasti R2, pomocou ktorej sa vyberie populácia buniek bez prítomnosti propídium-jodidu (kanál FL3 alebo FL4). Životaschopnosť buniek možno vypočítať v analytickom programe cytometra pomocou rovnice uvedenej ďalej. V prípade nízkej životaschopnosti buniek je možné získať až 20 000 buniek vrátane mŕtvych buniek. Údaje možno prípadne získať počas jednej minúty po začatí analýzy.

$$Životaschopnosť\ buniek = \frac{Počet\ živých\ buniek}{Celkový\ počet\ získaných\ buniek} \times 100$$

Potom sa zmeria percentuálny podiel buniek pozitívnych z hľadiska FL1 spomedzi týchto životaschopných buniek nachádzajúcich sa v ohraničenej oblasti R2 (v rámci ohraničenej oblasti R1). Expresia CD86 na povrchu buniek sa analyzuje v bodovom grafe FL1/SSC obsahujúcom ohraničenú oblasť (oblasti) životaschopných buniek (R2).

V prípade jamiek s úplným rastovým médiom/IgG1 sa marker analýzy stanoví blízko hlavnej populácie, aby sa IgG1 v kontrolách s úplným rastovým médiom nachádzali v cieľovej zóne 0,6 až 0,9 %.

Farebná interferencia sa vymedzuje ako posun v bodovom grafe znázorňujúcom IgG1 označené pomocou FITC (hodnota SI geometrického priemeru IgG1 FL1 ≥ 150 %).

Stimulačný index (SI) CD86 v prípade buniek v kontrolách (neošetrené alebo rozmiešané v 0,4 % DMSO) a buniek ošetrených chemikáliou sa vypočíta pomocou tejto rovnice:.

$$S.I. = \frac{\%\ ošetrených\ buniek 86^{+} - \%\ ošetrených\ buniek\ IgG1^{+}}{\%\ kontrolných\ buniek\ CD86^{+} - \%\ kontrolných\ buniek\ IgG1^{+}} \times 100$$

% neošetrených kontrolných buniek $IgG1^{+}$: označuje percentuálny podiel buniek IgG1 pozitívnych z hľadiska FL1, ktoré sú vymedzené spomedzi životaschopných neošetrených buniek pomocou markera analýzy (prijateľný rozsah ≥ 0,6 % a < 1,5 %, pozri odsek 22).

% kontrolných/ošetrených buniek $IgG1^{+}/CD86^{+}$: označuje percentuálny podiel buniek IgG1/CD86 pozitívnych z hľadiska FL1, ktoré sú vymedzené spomedzi životaschopných kontrolných/ošetrených buniek bez premiestnenia markera analýzy.

▼**M8**

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Hodnotenie údajov

20. V teste U-SENS™ sa vypočítajú tieto parametre: hodnota CV70, t. j. koncentrácia, pri ktorej sa prejavuje 70 % prežitie buniek U937 (30 % cytotoxicita), a hodnota EC150, t. j. koncentrácia, pri ktorej testované chemikálie vyvolali stimulačný index (SI) pre CD86 na úrovni 150 %.

Hodnota CV70 sa vypočíta pomocou logaritmickej lineárnej interpolácie na základe tejto rovnice:

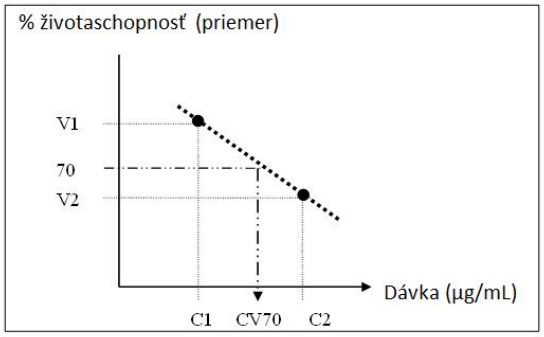
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70)/(V1 - V2) \times (C2 - C1)]$$

Keď:

V1 je minimálna hodnota životaschopnosti buniek nad 70 %,

V2 je maximálna hodnota životaschopnosti buniek pod 70 %,

C1 a C2 sú koncentrácie, pri ktorých sa prejavuje hodnota životaschopnosti buniek V1, resp. V2.



Na odvodenie hodnoty CV70 možno použiť aj iné prístupy, pokiaľ sa preukáže, že to nemá vplyv na výsledky (napr. pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti).

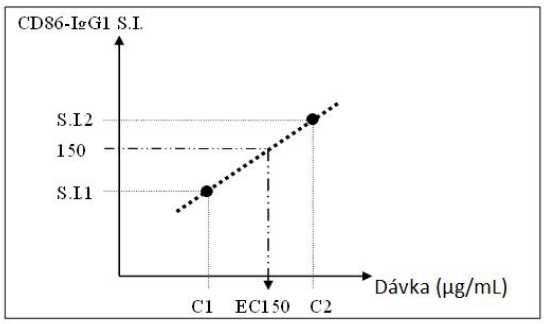
Hodnota EC150 sa vypočíta pomocou logaritmickej lineárnej interpolácie na základe tejto rovnice:

$$EC150 = C1 + [(150 - SI\ 1)/(SI\ 2 - SI\ 1) \times (C2 - C1)]$$

Keď:

C1 je najvyššia koncentrácia v µg/ml s hodnotou SI pre CD86 < 150 % (SI 1),

C2 je najnižšia koncentrácia v µg/ml s hodnotou SI pre CD86 ≥ 150 % (SI 2).



▼M8

Hodnoty EC150 a CV70 sa vypočítajú

— pre každý testovací cyklus: jednotlivé hodnoty EC150 a CV70 slúžia ako nástroje na skúmanie účinku zvýšenia CD86 v závislosti od koncentrácie (pozri odsek 14),

— na základe priemerných hodnôt životaschopnosti; stanoví sa celková hodnota CV70 (12),

— na základe priemeru SI hodnôt CD86; stanoví sa celková hodnota EC150 pre testovanú chemikáliu, ktorá sa na základe prognózy v teste U-SENS™ považuje za POZITÍVNU (pozri odsek 21) (12).

Prognostický model

21. Na účely merania expresie CD86 sa každá testovaná chemikália testuje najmenej v štyroch koncentráciách a najmenej v dvoch nezávislých testovacích cykloch (uskutočnených v rôznych dňoch), aby sa odvodila jedna prognóza (NEGATÍVNA alebo POZITÍVNA).

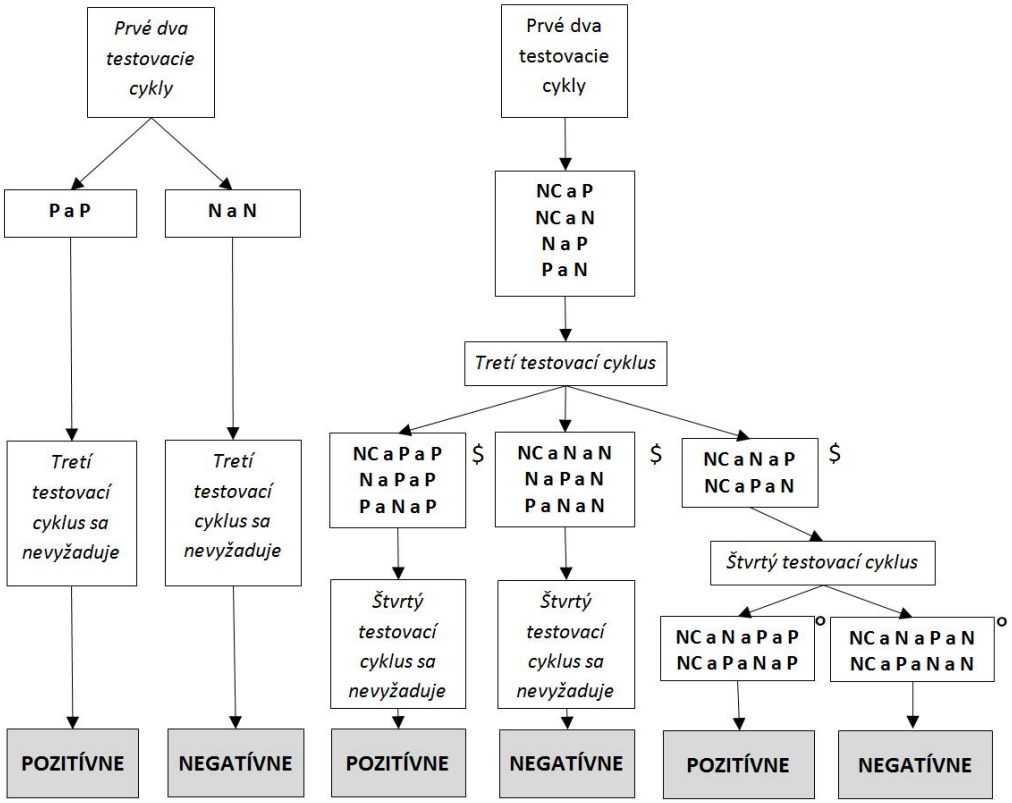
— Jednotlivý záver testovacieho cyklu U-SENS™ sa považuje za negatívny (ďalej len „N“), ak je SI pre CD86 nižší ako 150 % pri všetkých necytotoxických koncentráciách (životaschopnosť buniek ≥ 70 %) a ak sa nepozoruje žiadna interferencia (cytotoxicita, rozpustnosť: pozri odsek 18 alebo farba: pozri odsek 19 bez ohľadu na necytotoxické koncentrácie, pri ktorých sa zistí interferencia). Vo všetkých ostatných prípadoch: ak je SI pre CD86 vyšší než alebo sa rovná 150 % a/alebo ak sa pozorujú interferencie, jednotlivý záver testovacieho cyklu U-SENS™ sa považuje za pozitívny (ďalej len „P“).

— Prognóza v teste U-SENS™ sa považuje za NEGATÍVNU, ak sú najmenej dva nezávislé testovacie cykly negatívne (N) (obrázok 1). Ak sú oba prvé testovacie cykly negatívne (N), prognóza v teste U-SENS™ sa považuje za NEGATÍVNU a tretí testovací cyklus nie je potrebné uskutočniť.

— Prognóza v teste U-SENS™ sa považuje za POZITÍVNU, ak sú najmenej dva nezávislé testovacie cykly pozitívne (P) (obrázok 1). Ak sú oba prvé testovacie cykly pozitívne (P), prognóza v teste U-SENS™ sa považuje za POZITÍVNU a tretí testovací cyklus nie je potrebné uskutočniť.

— Keďže sa neuskutočňuje skúška na stanovenie dávky, existuje výnimka v prípade, že v prvom testovacom cykle je SI pre CD86 vyšší než alebo sa rovná 150 % len pri najvyššej necytotoxickej koncentrácii. Testovací cyklus sa v takom prípade považuje za NEJEDNOZNAČNÝ (NC) a v dodatočných testovacích cykloch je potrebné testovať ďalšie koncentrácie (v rozsahu od najvyššej necytotoxickej koncentrácie po najnižšiu cytotoxickú koncentráciu – pozri odsek 20). V prípade, že je testovací cyklus identifikovaný ako NC, je potrebné vykonať najmenej dva dodatočné testovacie cykly, ako aj štvrtý testovací cyklus v prípade, že výsledky testovacích cyklov 2 a 3 nie sú zhodné (nezávisle N a/alebo P) (obrázok 1). Nasledujúce testovacie cykly sa budú považovať za pozitívne, aj keď sa len pri jednej necytotoxickej koncentrácii dosiahne hodnota CD86 rovnaká alebo vyššia ako 150 %, keďže sa nastavenie koncentrácie upravilo podľa konkrétnej testovanej chemikálie. Pri konečnej prognóze sa bude vychádzať z väčšinového výsledku troch alebo štyroch individuálnych testovacích cyklov (t. j. 2 z 3 alebo 2 zo 4) (obrázok 1).

▼**M8**



Obrázok 1: Prognostický model použitý v teste U-SENS™ Prognóza v teste U-SENS™ by sa mala posudzovať v rámci IATA a v súlade s ustanoveniami odsekov 4, 7, 8 a 9 všeobecného úvodu.

N: testovací cyklus bez pozorovania pozitívnej hodnoty CD86 alebo interferencie,

P: testovací cyklus s pozorovanou pozitívnou hodnotou CD86 a/alebo interferenciou,

NC: nejednoznačné. Prvý testovací cyklus s nejednoznačným výsledkom, keď je CD86 pozitívne len pri najvyššej necytotoxickej koncentrácii,

#: Nejednoznačný (NC) individuálny záver dosiahnutý len pri prvom testovacom cykle automaticky znamená potrebu tretieho testovacieho cyklu, aby sa dosiahla väčšina pozitívnych (P) alebo negatívnych (N) záverov aspoň v 2 z 3 nezávislých testovacích cyklov.

$: V políčkach sa uvádzajú relevantné kombinácie výsledkov z troch testovacích cyklov na základe výsledkov získaných v prvých dvoch testovacích cykloch uvedených v predchádzajúcom políčku.

°: V políčkach sa uvádzajú relevantné kombinácie výsledkov zo štyroch testovacích cyklov na základe výsledkov získaných v prvých troch testovacích cykloch uvedených v predchádzajúcom políčku.

Kritériá prijateľnosti

22. Pri použití testu U-SENS™ majú byť splnené tieto kritériá prijateľnosti (12).

— Na konci obdobia expozície v trvaní 45 ±3 hod. dosiahla priemerná životaschopnosť neošetrených buniek U937 testovaných trojmo hodnotu > 90 % a nepozoroval sa posun v expresii CD86. Bazálna expresia CD86 neošetrených buniek U937 bola v rozsahu ≥ 2 % a ≤ 25 %.

▼M8

— Keď sa ako rozpúšťadlo používa DMSO, platnosť kontroly s nosičom DMSO sa posudzuje vypočítaním SI pre DMSO v porovnaní s neošetrenými bunkami, pričom priemerná životaschopnosť buniek testovaných trojmo musela byť > 90 %. Kontrola s nosičom DMSO je platná, ak stredná hodnota trojmo vypočítaného SI pre CD86 bola nižšia než 250 % strednej hodnoty trojmo vypočítaného SI pre CD86 v prípade neošetrených buniek U937.

— Testovacie cykly sa považujú za platné, ak aspoň dve z troch hodnôt IgG1 neošetrených buniek U937 patria do rozsahu ≥ 0,6 % a < 1,5 %.

— Súbežne testovaná negatívna kontrola (kyselina mliečna) sa považuje za platnú, ak aspoň dva z troch replikátov boli negatívne (SI pre CD86 < 150 %) a necytotoxické (životaschopnosť buniek ≥ 70 %).

— Pozitívna kontrola (TNBS) sa považuje za platnú, ak aspoň dva z troch replikátov boli pozitívne (SI pre CD86 ≥ 150 %) a necytotoxické (životaschopnosť buniek ≥ 70 %).

Správa o teste

23. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália

Jednozložkové látky

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť v úplnom rastovom médiu, rozpustnosť v DMSO, molekulová hmotnosť a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,

— testované koncentrácie,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— čo najpodrobnejšia charakterizácia, napr. prostredníctvom chemickej identity (pozri vyššie), čistoty, kvantitatívneho výskytu a relevantných fyzikálno-chemických vlastností (pozri vyššie) zložiek v dostupnom rozsahu,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť v úplnom rastovom médiu, rozpustnosť v DMSO a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu,

— molekulová hmotnosť alebo relatívna molekulová hmotnosť v prípade zmesí/polymérov známeho zloženia alebo iné informácie potrebné na vykonanie štúdie,

— úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,

— testované koncentrácie,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu.

▼**M8**

Kontroly

Pozitívna kontrola

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť v DMSO, molekulová hmotnosť a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu a podľa potreby,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,

— testované koncentrácie,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— v uplatniteľnom prípade odkaz na historické výsledky pre pozitívne kontroly dokazujúce vhodné kritériá prijateľnosti testovacieho cyklu.

Negatívna kontrola a kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— fyzický vzhľad, molekulová hmotnosť a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v prípade, že sa použijú iné kontrolné rozpúšťadlá/nosiče ako tie uvedené v usmernení na vykonávanie testov, a to v dostupnom rozsahu,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu.

Podmienky testu

— meno a adresa objednávateľa, testovacieho zariadenia a vedúceho štúdie,

— opis použitého testu,

— použitá bunková línia, podmienky jej skladovania a zdroj (napr. zariadenie, z ktorého bola získaná),

— použitá prietoková cytometria (napr. model) vrátane použitých nastavení prístroja, protilátok a markera cytotoxicity,

— postup použitý na preukázanie spôsobilosti laboratória vykonávať daný test testovaním chemikálií na preukázanie spôsobilosti a postup použitý na preukázanie opakovateľného vykonávania testu v priebehu času, napr. údaje o historických kontrolách a/alebo údaje o historických kontrolách reaktivity.

Kritériá prijateľnosti testu

— hodnoty životaschopnosti buniek a hodnoty SI pre CD86 získané pomocou kontroly s aplikáciou rozpúšťadla/kontroly s nosičom v porovnaní s rozsahmi prijateľnosti,

▼**M8**

— hodnoty životaschopnosti buniek a hodnoty SI získané pomocou pozitívnej kontroly v porovnaní s rozsahmi prijateľnosti,

— životaschopnosť buniek pri všetkých testovaných koncentráciách testovanej chemikálie.

Testovací postup

— počet použitých testovacích cyklov,

— použité koncentrácie testovaných chemikálií, ich použitie a expozičný čas (ak sa líšia od odporúčaných),

— dĺžka expozície,

— opis použitých kritérií hodnotenia a rozhodovania,

— opis všetkých zmien v testovacom postupe.

Výsledky

— údaje v tabuľkovej podobe vrátane CV70 (v uplatniteľnom prípade), SI, hodnôt životaschopnosti buniek, hodnôt EC150 (v uplatniteľnom prípade) získaných pri testovanej chemikálii a pri pozitívnej kontrole v každom testovacom cykle, ako aj uvedenie hodnotenia testovanej chemikálie podľa prognostického modelu,

— v uplatniteľnom prípade opis všetkých relevantných pozorovaní.

Rozbor výsledkov

— rozbor výsledkov získaných pomocou testu U-SENS™,

— posúdenie výsledkov testu v kontexte IATA, ak sú k dispozícii iné relevantné informácie.

Závery

LITERATÚRA

(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. K dispozícii na lokalite: 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 10.2760/588955. K dispozícii na lokalite: [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. K dispozícii na lokalite: 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. K dispozícii na lokalite: [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, 1683 – 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. K dispozícii na lokalite: 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™), s. 33. K dispozícii na lokalite: [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. K dispozícii na lokalite: 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. K dispozícii na lokalite: 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. K dispozícii na lokalite: 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. K dispozícii na lokalite: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

▼M8

Dodatok 2.1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: miera zhody výsledkov testu s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o mieru výkonnosti testu a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testu (14).

AOP (dráha nepriaznivého účinku): sled udalostí od chemickej štruktúry cieľovej chemikálie alebo skupiny podobných chemikálií cez molekulárnu iniciačnú udalosť až po výsledok *in vivo*, ktorý je predmetom záujmu (15).

Reakcia v závislosti od koncentrácie CD86: označuje závislosť od koncentrácie (alebo reakciu v závislosti od koncentrácie), keď za pozitívnou koncentráciou (CD86 SI ≥ 150) nasleduje koncentrácia s rastúcou hodnotou CD86 SI.

Chemikália: látka alebo zmes.

CV70: odhadovaná koncentrácia, pri ktorej sa pozoruje 70 % životaschopnosť buniek.

Posun: posun je vymedzený tým, že i) korigovaná hodnota $\%CD86^{+}$ replikátu 3 neošetrenej kontroly je nižšia ako 50 % strednej korigovanej hodnoty $\%CD86^{+}$ replikátov 1 a 2 neošetrenej kontroly a ii) korigovaná hodnota $\%CD86^{+}$ replikátu 3 negatívnej kontroly je nižšia ako 50 % strednej korigovanej hodnoty $\%CD86^{+}$ replikátov 1 a 2 negatívnej kontroly.

EC150: odhadované koncentrácie, pri ktorých sa vykazuje 150 % SI expresie CD86.

Prietoková cytometria: cytometrická technika, pri ktorej bunky rozmiešané v kvapaline prechádzajú jednotlivo cez ohnisko excitovaného svetla, ktoré je rozptýlené podľa vzorov charakteristických pre bunky a ich zložky. Bunky sa často označujú pomocou fluorescenčných markerov, vďaka čomu sa svetlo najskôr absorbuje a následne emituje v zmenených frekvenciách.

Nebezpečnosť: inherentná vlastnosť činidla, prípadne situácia, ktorá môže vyvolať nepriaznivé účinky pri expozícii organizmu, systému alebo (sub)populácie účinkom daného činidla.

IATA (integrovaný prístup k testovaniu a hodnoteniu): štruktúrovaný prístup používaný na identifikáciu (potenciálnej) nebezpečnosti, charakterizáciu nebezpečnosti (z hľadiska potencie) a/alebo hodnotenie bezpečnosti (potenciál/potencia a expozícia) chemikálie alebo skupiny chemikálií, ktorý strategicky integruje a porovnáva všetky relevantné údaje v záujme prijatia regulačného rozhodnutia o potenciálnej nebezpečnosti a/alebo riziku a/alebo potrebe vykonania ďalších cielených, t. j. minimálnych testov.

Zmes: zmes alebo roztok zložený z dvoch alebo viacerých látok.

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej 80 hm. %.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii ≥ 10 hm. % a < 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo k chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

▼M8

Pozitívna kontrola: replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému a ošetrený látkou, ktorá je známa tým, že vyvoláva pozitívnu reakciu. Aby bolo možné vyhodnotiť variabilitu reakcie na pozitívnu kontrolu v čase, nesmie byť rozsah pozitívnej reakcie nadmerne veľký.

Pre-haptény: chemikálie, ktoré sa stávajú senzibilizátormi prostredníctvom abiotickej transformácie, napr. oxidácie.

Pro-haptény: chemikálie, pri ktorých sa vyžaduje enzymatická aktivácia na to, aby vznikol potenciál kožnej senzibilizácie.

Relevantnosť: opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej sa testom správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testu (14).

Spoľahlivosť: miera rozsahu, v rámci ktorého sa môže test počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Hodnotí sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a vnútrolaboratórnej opakovateľnosti (14).

Testovací cyklus: testovací cyklus pozostáva z jednej alebo viacerých testovaných chemikálií testovaných súbežne s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla/kontrolou s nosičom a s pozitívnou kontrolou.

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testu, ktorý poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testu (14).

SI: stimulačný index. Relatívne hodnoty geometrického priemeru intenzity fluorescencie v bunkách ošetrených chemikáliou v porovnaní s bunkami ošetrenými rozpúšťadlom.

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom: neošetrená vzorka obsahujúca všetky zložky testovacieho systému okrem testovanej chemikálie, ale vrátane použitého rozpúšťadla/nosiča. Slúži na stanovenie základnej reakcie vzoriek ošetrených testovanou chemikáliou rozpustenou alebo stabilne rozmiešanou v rovnakom rozpúšťadle/nosiči. Keď sa táto vzorka testuje so súbežnou kontrolou s rastovým médiom, preukáže sa aj to, či rozpúšťadlo/nosič a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testu, ktorý poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testu (14).

Vyfarbovací tlmivý roztok: fosfátový tlmivý fyziologický roztok obsahujúci 5 % fetálneho teľacieho séra.

Látka: chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie ich stability a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ktorý však nezahŕňa žiadne rozpúšťadlá, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo zmeny jej zloženia.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tohto testu.

▼M8

Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií OSN (GHS OSN): systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálnej, zdravotnej a environmentálnej nebezpečnosti a ich označovanie zodpovedajúcimi komunikačnými prvkami, ako sú piktogramy, výstražné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o nepriaznivých účinkoch daných chemikálií v záujme ochrany osôb (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a subjektov reakcie na núdzové situácie) a životného prostredia (16).

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

Platný test: test, ktorý sa na daný účel považuje za dostatočne relevantný a spoľahlivý a ktorý je založený na vedecky podložených zásadách. Test nie je nikdy platný v absolútnom zmysle, ale len vo vzťahu k vymedzenému účelu (14).

▼**M8**

Dodatok 2.2

LÁTKY NA PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

Pred rutinným použitím testu opísaného v tomto dodatku k testovacej metóde B.71 by mali laboratóriá preukázať technickú spôsobilosť tým, že správne získajú očakávanú prognózu výsledku skúšky U-SENS™ v prípade 10 chemikálií odporúčaných v tabuľke 1 a získajú hodnoty CV70 a EC150, ktoré patria do príslušného referenčného rozsahu pre najmenej 8 z 10 látok na preukázanie spôsobilosti. Látky na preukázanie spôsobilosti boli vybrané tak, aby reprezentovali rozsah reakcií z hľadiska nebezpečenstva kožnej senzibilizácie. Medzi ďalšie výberové kritériá patrilo to, aby boli látky komerčne dostupné a aby boli dostupné referenčné údaje *in vivo* s vysokou kvalitou, ako aj údaje *in vitro* s vysokou kvalitou vygenerované pomocou testu U-SENS™. Pre test U-SENS™ sú k dispozícii aj publikované referenčné údaje (1) (8).

Tabuľka 1

Odporúčané látky na preukazovanie technickej spôsobilosti pri teste U-SENS™

Látky na preukázanie spôsobilosti	Registračné číslo CAS	Skupenstvo	Prognóza *in vivo* (1)	U-SENS™ Rozpúšťadlo/nosič	U-SENS™ Referenčný rozsah CV70 v µg/ml (2)	U-SENS™ Referenčný rozsah EC150 v µg/ml (2)
4-fenyléndiamín	106-50-3	tuhé	senzibilizátor (silný)	úplné rastové médium (3)	< 30	pozitívne (≤ 10)
kyselina 2,4,6-trinitrobenzénsulfónová trihydrát	2508-19-2	kvapalné	senzibilizátor (silný)	úplné rastové médium	> 50	pozitívne (≤ 50)
dietylmaleát	141-05-9	kvapalné	senzibilizátor (mierny)	DMSO	10 – 100	pozitívne (≤ 20)
rezorcinol	108-46-3	tuhé	senzibilizátor (mierny)	úplné rastové médium	> 100	pozitívne (≤ 50)
škoricový alkohol	104-54-1	tuhé	senzibilizátor (slabý)	DMSO	> 100	pozitívne (10 – 100)
4-alylanizol	140-67-0	kvapalné	senzibilizátor (slabý)	DMSO	> 100	pozitívne (< 200)
sacharín	81-07-2	tuhé	nespôsobuje senzibilizáciu	DMSO	> 200	negatívne (> 200)
glycerol	56-81-5	kvapalné	nespôsobuje senzibilizáciu	úplné rastové médium	> 200	negatívne (> 200)
kyselina mliečna	50-21-5	kvapalné	nespôsobuje senzibilizáciu	úplné rastové médium	> 200	negatívne (> 200)
kyselina salicylová	69-72-7	tuhé	nespôsobuje senzibilizáciu	DMSO	> 200	negatívne (> 200)

Skratky: Registračné číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service)

(1) Prognóza nebezpečnosti a (potencie) *in vivo* na základe údajov LLNA (1) (8). Potencia *in vivo* je odvodená pomocou kritérií navrhnutých organizáciou ECETOC (17).

(2) Na základe historických pozorovaných hodnôt (1) (8).

(3) Úplné rastové médium: rastové médium RPMI-1640 doplnené o 10 % fetálne teľacie sérum, L-glutamín s koncentráciou 2 mM, 100 jednotiek/ml penicilínu a 100 µg/ml streptomycínu (8).

▼**M8**

Dodatok 3

KOŽNÁ SENZIBILIZÁCIA *IN VITRO*: SKÚŠKA IL-8 LUC

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

1. Na rozdiel od skúšok, v rámci ktorých sa analyzuje expresia povrchových bunkových markerov, sa v skúške IL-8 Luc kvantifikujú zmeny expresie IL-8, čo je cytokín súvisiaci s aktiváciou dendritových buniek (DC). V reportérovej bunkovej línii IL-8 odvodenej od THP-1 (THP-G8, stanovená z bunkovej línie THP-1 akútnej ľudskej monocytovej leukémie) sa expresia IL-8 meria po expozícii senzibilizátorom (1). Expresia luciferázy následne slúži ako pomôcka pri rozlišovaní medzi kožnými senzibilizátormi a látkami nespôsobujúcimi senzibilizáciu.

2. Skúška IL-8 Luc sa hodnotila v rámci validačnej štúdie (2) uskutočnenej organizáciou JaCVAM (Japanese Centre for the Validation of Alternatives Methods), **ministerstvom hospodárstva, obchodu a priemyslu** (METI) a organizáciou (**JSAAE Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments**) a následne bola predmetom nezávislého partnerského preskúmania (3) pod záštitou organizácie JaCVAM a ministerstva zdravotníctva, práce a sociálneho zabezpečenia (MHLW) s podporou **medzinárodnej spolupráce v oblasti alternatívnych testovacích metód** (ICATM). Na základe zváženia všetkých dostupných dôkazov a vstupov regulačných orgánov a zainteresovaných strán sa skúška IL-8 Luc považuje za užitočnú pri rozlišovaní medzi senzibilizátormi a látkami nespôsobujúcimi senzibilizáciu v rámci integrovaných prístupov k testovaniu a hodnoteniu (IATA) na účely klasifikácie a označovania nebezpečnosti. Príklady použitia údajov zo skúšky IL-8 Luc v kombinácii s inými informáciami sú uvedené v literatúre (4) (5) (6).

3. Preukázalo sa, že skúška IL-8 Luc je prenosná do laboratórií, ktoré majú skúsenosti v oblasti bunkových kultúr a meraní luciferázy. Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť bola 87,7 % a reprodukovateľnosť medzi laboratóriami bola 87,5 % (2). Z údajov získaných v rámci validačnej štúdie (2) a iných publikovaných prác (1) (6) vyplýva, že v porovnaní so skúškou LLNA sa pomocou skúšky IL-8 Luc vyhodnotilo 118 zo 143 chemikálií ako pozitívnych alebo negatívnych a 25 chemikálií ako nejednoznačných. Presnosť skúšky IL-8 Luc z hľadiska odlíšenia kožných senzibilizátorov (kategória 1 podľa GHS OSN/CLP) od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu („bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP) je 86 % (101/118) s citlivosťou 96 % (92/96) a špecifickosťou 41 % (9/22). Pri vylúčení látok nepatriacich do oblasti použiteľnosti opísanej ďalej (odsek 5) sa pomocou skúšky IL-8 Luc vyhodnotilo 113 zo 136 chemikálií ako pozitívnych alebo negatívnych a 23 chemikálií ako nejednoznačných. Presnosť skúšky IL-8 Luc je 89 % (101/113) s citlivosťou 96 % (92/96) a špecifickosťou 53 % (9/17). Na základe údajov o ľuďoch, ako ich uvádza Urbisch a kol. (7), sa pomocou skúšky IL-8 Luc vyhodnotilo 76 z 90 chemikálií ako pozitívnych alebo negatívnych a 14 chemikálií ako nejednoznačných. Presnosť skúšky je 80 % (61/76), citlivosť 93 % (54/58) a špecifickosť 39 % (7/18). Pri vylúčení látok nepatriacich do oblasti použiteľnosti sa pomocou skúšky IL-8 Luc vyhodnotilo 71 z 84 chemikálií ako pozitívnych alebo negatívnych a 13 chemikálií ako nejednoznačných. Presnosť je 86 % (61/71) s citlivosťou 93 % (54/58) a špecifickosťou 54 % (7/13). V prípade skúšky IL-8 Luc je výskyt falošne negatívnych prognóz pravdepodobnejší pri chemikáliách s nízkou/miernou potenciou z hľadiska kožnej senzibilizácie (podkategória 1B podľa GHS OSN/CLP) než pri chemikáliách s vysokou potenciou

▼M8

(podkategória 1A podľa GHS OSN/CLP) (6). Celkovo je z týchto informácií zrejmý význam skúšky IL-8 Luc pri identifikácii nebezpečenstva kožnej senzibilizácie. Presnosť, ktorá sa uvádza v prípade skúšky IL-8 Luc ako samostatného testu, slúži len ako usmernenie, keďže tento test by sa mal posudzovať v spojení s inými zdrojmi informácií v kontexte IATA a v súlade s ustanoveniami odsekov 7 a 8 všeobecného úvodu. Okrem toho by sa pri hodnotení testov na zistenie kožnej senzibilizácie bez použitia zvierat malo pamätať na to, že test LLNA a iné testy na zvieratách nemusia v plnej miere odzrkadľovať situáciu u ľudí.

4. Na základe v súčasnosti dostupných údajov sa ukázalo, že skúšku IL-8 Luc je možné použiť v prípade testovaných chemikálií zahŕňajúcich viacero organických funkčných skupín, reakčných mechanizmov, potencií kožnej senzibilizácie (stanovených štúdiami *in vivo*) a fyzikálno-chemických vlastností (2) (6).

5. Hoci sa pri skúške IL-8 Luc používa ako rozpúšťadlo X-VIVO™ 15, správne sa pomocou nej vyhodnotili chemikálie s hodnotou Log K_{ow} > 3,5 a chemikálie s rozpustnosťou vo vode pri koncentrácii približne 100 µg/ml podľa výpočtu v softvéri EPI Suite™ a výkonnosť tejto skúšky pri detekcii senzibilizátorov so slabou rozpustnosťou vo vode je lepšia, než keď sa pri skúške IL-8 Luc použije ako rozpúšťadlo dimetylsulfoxid (DMSO) (2). V prípade negatívnych výsledkov pre testované chemikálie, ktoré nie sú rozpustné pri koncentrácii 20 mg/ml, však môže dochádzať k falošne negatívnym výsledkom v dôsledku ich nerozpustnosti v rozpúšťadle X-VIVO™ 15. Negatívne výsledky pre tieto chemikálie sa preto nemajú brať do úvahy. Vo validačnej štúdii sa zistila vysoká miera falošnej negativity v prípade anhydridov. Okrem toho môžu z dôvodu obmedzenej metabolickej kapacity bunkovej línie (8) a experimentálnych podmienok vykazovať v rámci skúšky negatívne výsledky aj pro-haptény (látky vyžadujúce metabolickú aktiváciu) a pre-haptény (látky aktivované atmosférickou oxidáciou). Napriek tomu, hoci negatívne výsledky získané pri predpokladaných pre-hapténoch/pro-hapténoch je potrebné interpretovať obozretne, sa pomocou skúšky IL-8 Luc správne vyhodnotilo 11 z 11 pre-hapténov, 6 zo 6 pro-hapténov a 6 z 8 pre-hapténov/pro-hapténov v rámci množiny údajov skúšky IL-8 Luc (2). Na základe súčasného komplexného preskúmania troch testov, pri ktorých sa nevyužívajú zvieratá, (DPRA, KeratinoSens™ a h-CLAT) na detekciu pre-hapténov a pro-hapténov (9) a na základe skutočnosti, že bunky THP-G8 použité v skúške IL-8 Luc predstavujú bunkovú líniu odvodenú od THP-1, ktorá sa používa v teste h-CLAT, skúška IL-8 Luc môže prispieť aj k zvýšeniu citlivosti testov, pri ktorých sa nevyužívajú zvieratá, na detekciu pre-hapténov a pro-hapténov v kombinácii s inými testmi. V prípade doteraz testovaných povrchovo aktívnych látok sa bez ohľadu na ich typ (napr. katiónové, aniónové alebo neiónové) zaznamenali (falošne) pozitívne výsledky. A nakoniec, chemikálie, pri ktorých dochádza k interferencii s luciferázou, môžu zneprehľadniť jej aktivitu/meranie, čím dochádza k zdanlivej inhibícii alebo k zvýšenej luminiscencii (10). V iných skúškach s reportérovými génmi luciferázy boli napríklad zaznamenané interferencie fytoestrogénu v koncentráciách nad 1 µM s luminiscenčnými signálmi z dôvodu nadmernej aktivácie reportérového génu luciferázy. Preto je potrebné dôkladne preskúmať expresiu luciferázy dosahovanú pri vysokých koncentráciách fytoestrogénov alebo zlúčenín, pri ktorých existuje podozrenie na vyvolanie aktivácie reportérového génu luciferázy podobne ako pri fytoestrogénoch (11). Na základe toho sú z oblasti použiteľnosti tejto skúšky vylúčené povrchovo aktívne látky, anhydridy a chemikálie, pri ktorých dochádza k interferencii s luciferázou. V prípade, že existujú dôkazy o nepoužiteľnosti skúšky IL-8 Luc na iné špecifické kategórie testovaných chemikálií, by sa tento test nemal pri týchto špecifických kategóriách použiť.

6. Ako bolo opísané vyššie, skúška IL-8 Luc umožňuje rozlišovanie medzi kožnými senzibilizátormi a látkami nespôsobujúcimi senzibilizáciu. Na to, aby bolo možné určiť, či výsledky skúšky IL-8 Luc môžu v kombinácii s ďalšími zdrojmi informácií prispieť k posudzovaniu potencie, však bude potrebná ďalšia práca, pokiaľ možno založená na údajoch týkajúcich sa človeka.

▼**M8**

7. Vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 3.1.

PRINCÍP TESTU

8. V skúške IL-8 Luc sa využíva bunková línia THP-1 ľudskej monocytovej leukémie, ktorá pochádza z organizácie ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virgínia, USA). Pomocou tejto bunkovej línie vytvorila katedra dermatológie na lekárskej fakulte univerzity v Tohoku reportérovú bunkovú líniu IL-8 odvodenú od THP-1 s označením THP-G8, v ktorej sa nachádza gén luciferázy SLO (stabilná luciferáza emitujúca oranžové svetlo) riadený promótorom IL-8 a gén luciferázy SLR (stabilná luciferáza emitujúca červené svetlo) riadený promótorom glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy (GAPDH) (1). Je tak možné kvantitatívne meranie indukcie génu luciferázy pomocou detekcie luminiscencie z osvedčených substrátov luciferázy, ktoré vytvárajú svetlo a slúžia ako indikátor pôsobenia IL-8 a GAPDH v bunkách po expozícii chemikáliám spôsobujúcim senzibilizáciu.

9. Dvojfarebný skúšobný systém obsahuje luciferázu emitujúcu oranžové svetlo (SLO; λmax = 580 nm) (12) pre génovú expresiu promótora IL-8, ako aj luciferázu emitujúcu červené svetlo (SLR; λmax = 630 nm) (13) pre génovú expresiu promótora vnútornej kontroly, GAPDH. Tieto dva druhy luciferázy emitujú svetlo odlišnej farby pri reakcii s d-luciferínom svetlušky svätojánskej a ich luminiscencia sa meria súčasne v rámci jednokrokovej reakcie rozkladom emisie zo skúšobnej zmesi pomocou optického filtra (14) (dodatok 3.2).

10. Bunky THP-G8 sa 16 hodín ošetrujú pomocou testovanej chemikálie. Potom sa zmeria aktivita luciferázy SLO (SLO-LA) odrážajúca pôsobenie promótora IL-8 a aktivita luciferázy SLR (SLR-LA) odrážajúca pôsobenie promótora GAPDH. SLO-LA sa označuje ako IL8LA a SLR-LA ako GAPLA, aby boli skratky jednoducho zrozumiteľné. V tabuľke 1 sa uvádza opis výrazov súvisiacich s aktivitou luciferázy v skúške IL-8 Luc. Namerané hodnoty slúžia na výpočet normalizovanej hodnoty IL8LA (nIL8LA), ktorá predstavuje pomer IL8LA ku GAPLA, na výpočet indukcie nIL8LA (Ind-IL8LA), ktorá predstavuje pomer aritmetických priemerov štvornásobne nameraných hodnôt nIL8LA buniek THP-G8 ošetrených testovanou chemikáliou a hodnôt nIL8LA neošetrených buniek THP-G8, a na výpočet inhibície GAPLA (Inh-GAPLA), ktorá predstavuje pomer aritmetických priemerov štvornásobne nameraných hodnôt GAPLA buniek THP-G8 ošetrených testovanou chemikáliou a hodnôt GAPLA neošetrených buniek THP-G8 a slúži ako indikátor cytotoxicity.

Tabuľka 1

Opis výrazov súvisiacich s aktivitou luciferázy v skúške IL-8 Luc

Skratky	Vymedzenie pojmu
GAPLA	aktivita luciferázy SLR odrážajúca pôsobenie promótora GAPDH
IL8LA	aktivita luciferázy SLO odrážajúca pôsobenie promótora IL-8
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA buniek THP-G8 ošetrených chemikáliami/nIL8LA neošetrených buniek

▼**M8**

Skratky	Vymedzenie pojmu
Inh-GAPLA	GAPLA buniek THP-G8 ošetrených chemikáliami/GAPLA neošetrených buniek
CV05	Najnižšia koncentrácia chemikálie, pri ktorej sa hodnota Inh-GAPLA stáva < 0,05.

11. K dispozícii sú normy výkonnosti (PS) (15) na uľahčenie validácie upravených testov *in vitro* luciferázy IL-8, ktoré sú podobné skúške IL-8 Luc, a umožnenie včasnej zmeny usmernenia OECD 442E na vykonávanie testov na účely začlenenia týchto testov. Vzájomné uznávanie údajov (MAD) podľa dohody OECD bude možné garantovať len pri testoch validovaných podľa týchto noriem výkonnosti v prípade, že OECD tieto testy preskúmala a začlenila do usmernenia 442E na vykonávanie testov (16).

PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

12. Pred rutinným používaním testu opísaného v tomto dodatku k testovacej metóde B.71 by mali laboratóriá preukázať technickú spôsobilosť použitím 10 látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 3.3 v súlade so správnymi postupmi metód *in vitro* (17). Používatelia testu majú okrem toho viesť historickú databázu údajov vytvorených na základe kontrol reaktivity (pozri odsek 15) a pozitívnych kontrol a kontrol s aplikáciou rozpúšťadla/kontrol s nosičom (pozri odseky 21 – 24) a na základe týchto údajov potvrdiť, že sa v priebehu času zachováva reprodukovateľnosť testu v ich laboratóriu.

POSTUP

13. Ku skúške IL-8 Luc sú k dispozícii štandardné operačné postupy, ktoré sa majú používať pri vykonávaní tohto testu (18). Laboratóriá, ktoré majú v úmysle vykonávať test, môžu získať rekombinantnú bunkovú líniu THP-G8 z laboratória GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonsko, po podpísaní dohody o prenose materiálu (MTA) v súlade s podmienkami šablóny OECD. V nasledujúcich odsekoch sú opísané hlavné zložky a postupy skúšky.

Príprava buniek

14. Na vykonávanie skúšky IL-8 Luc sa používa bunková línia THP-G8 z laboratória GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonsko (pozri odseky 8 a 13). Po prijatí sa bunky namnožia (2 až 4 pasáže) a skladujú sa zmrazené ako homogénna zásoba. Bunky z tejto zásoby možno rozmnožovať až po maximálny počet 12 pasáží alebo maximálne počas 6 týždňov. Rastové médium, ktoré sa používa na rozmnožovanie, je kultivačné médium RPMI-1640, ktoré obsahuje 10 % bovinné fetálne sérum (FBS), roztok antibiotík/antimykotík (100 jednotiek/ml penicilínu G, 100 µg/ml streptomycínu a 0,25 µg/ml amfotericínu B v 0,85 % fyziologickom roztoku) (napr. GIBCO kat. č. 15240-062), 0,15 µg/ml puromycínu (napr. CAS: 58-58-2) a 300 µg/ml G418 (napr. CAS: 108321-42-2).

15. Pred použitím na testovanie sa bunky kvalifikujú uskutočnením kontroly reaktivity. Túto kontrolu je potrebné uskutočniť 1 – 2 týždne alebo 2 – 4 pasáže po rozmrazení pomocou 4-nitrobenzyl bromidu (4-NBB) (CAS: 100-11-8, čistota ≥ 99 %) ako pozitívnej kontroly a pomocou kyseliny mliečnej (LA) (CAS: 50-21-5, čistota ≥ 85 %) ako negatívnej kontroly. 4-NBB má vyvolať pozitívnu reakciu na Ind-IL8LA (≥ 1,4), zatiaľ čo LA má vyvolať negatívnu reakciu na Ind-IL8LA (< 1,4). V rámci skúšky sa použijú len bunky, ktoré vyhovejú pri kontrole reaktivity. Táto kontrola sa má uskutočniť podľa postupov opísaných v odsekoch 22 – 24.

▼M8

16. Na účely testovania sa bunky THP-G8 nasadia s hustotou 2 až 5 × 10^5 buniek/ml a 48 až 96 hodín sa kultivujú ako predkultúra v kultivačných bankách. V deň testu sa bunky zozbierané z kultivačných baniek premyjú pomocou RPMI-1640 s obsahom 10 % FBS bez antibiotík a následne sa resuspendujú pomocou RPMI-1640 s obsahom 10 % FBS bez antibiotík s koncentráciou 1 × 10^6 buniek/ml. Bunky sa ďalej rozdelia na 96-jamkovú čiernu mikrotitračnú platničku s plochým dnom (napr. Costar kat. č. 3603) s objemom 50 µl (5 × 10^4 buniek/jamka).

Príprava testovanej chemikálie a kontrolných látok

17. Testovaná chemikália a kontrolné látky sa pripravujú v deň testovania. V prípade skúšky IL-8 Luc sa testované chemikálie rozpustia v komerčne dostupnom rastovom médiu X-VIVO™ 15 bez obsahu séra (Lonza, 04-418Q) tak, aby sa dosiahla konečná koncentrácia 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 sa pridá k 20 mg testovanej chemikálie (bez ohľadu na rozpustnosť chemikálie) v skúmavke mikroodstredivky, aby sa dosiahol objem 1 ml, a následne sa intenzívne premiešava a pretrepáva na rotátore s maximálnou rýchlosťou 8 ot./min. počas 30 minút pri teplote okolia približne 20 °C. Ak sú tuhé chemikálie naďalej nerozpustné, skúmavka sa ďalej previbruje ultrazvukom, až kým sa chemikália úplne nerozpustí alebo stabilne nerozmieša. V prípade testovaných chemikálií rozpustných v X-VIVO™ 15 sa roztok rozriedi faktorom 5 pomocou X-VIVO™ 15 a slúži ako zásobný roztok X-VIVO™ 15 s testovanou chemikáliou (4 mg/ml). V prípade testovaných chemikálií nerozpustných v X-VIVO™ 15 sa zmes znova pretrepáva na rotátore najmenej 30 minút a potom sa 5 minút odstreďuje pri 15000 ot./min. (≈ 20 000 *g*). Výsledný supernatant slúži ako zásobný roztok X-VIVO™ 15 s testovanou chemikáliou. Použitie iných rozpúšťadiel, napríklad DMSO, vody alebo rastového média, je potrebné vedecky odôvodniť. Podrobný postup rozpustenia chemikálií sa uvádza v dodatku 3.5. Roztoky X-VIVO™ 15 opísané v odsekoch 18 – 23 sa zmiešajú v objemovom pomere 1:1 s bunkovými suspenziami pripravenými v 96-jamkovej čiernej mikrotitračnej platničke s plochým dnom (pozri odsek 16).

18. Účelom prvého testovacieho cyklu je stanoviť cytotoxickú koncentráciu a preskúmať potenciál kožnej senzibilizácie chemikálií. Pomocou X-VIVO™ 15 sa vytvoria sériové riedenia zásobných roztokov X-VIVO™ 15 s testovanými chemikáliami s faktorom riedenia 2 (pozri dodatok 3.5) pomocou 96-jamkového skúšobného bloku (napr. Costar kat. č. EW-01729-03). Ďalej sa rozriedený roztok v objeme 50 µl/jamka pridá do 50 µl bunkovej suspenzie v 96-jamkovej čiernej mikrotitračnej platničke s plochým dnom. V prípade testovaných chemikálií rozpustných v X-VIVO ™ 15 tak budú konečné koncentrácie testovaných chemikálií v rozsahu od 0,002 do 2 mg/ml (dodatok 3.5). V prípade testovaných chemikálií nerozpustných v X-VIVO ™ 15 pri koncentrácii 20 mg/ml sa stanovia len faktory riedenia v rozsahu 2 až 2^{10}, hoci skutočné konečné koncentrácie testovaných chemikálií zostávajú neisté a závisia od nasýtenej koncentrácie testovaných chemikálií v zásobnom roztoku X-VIVO ™ 15.

19. V následných testovacích cykloch (t. j. druhý, tretí a štvrtý replikát) sa zásobný roztok X-VIVO™ 15 pripraví s koncentráciou, ktorá je štvornásobne vyššia ako koncentrácia pri životaschopnosti buniek 05 (CV05; najnižšia koncentrácia, pri ktorej je hodnota Inh-GAPLA < 0,05) v prvom pokuse. Ak Inh-GAPLA neklesne pod 0,05 pri najvyššej koncentrácii v prvom testovacom cykle, zásobný roztok X-VIVO™ 15 sa pripraví s najvyššou koncentráciou prvého testovacieho cyklu. Koncentrácia CV05 sa vypočíta ako podiel koncentrácie zásobného roztoku v prvom testovacom cykle a faktora riedenia pre CV05 (X) [faktor riedenia CV05 (X); faktor riedenia, ktorý sa požaduje na zriedenie zásobného roztoku na CV05] (pozri dodatok 3.5). V prípade testovaných látok nerozpustných v X-VIVO pri koncentrácii 20 mg/ml sa hodnota CV05 určí ako koncentrácia zásobného roztoku × 1/X. Pri testovacích cykloch 2 až 4 sa druhý zásobný roztok pripraví ako 4 × CV05 (dodatok 3.5).

▼**M8**

20. Sériové riedenia druhých zásobných roztokov X-VIVO™ 15 sa vytvoria s faktorom riedenia 1,5 pomocou 96-jamkového skúšobného bloku. Ďalej sa rozriedený roztok v objeme 50 µl/jamka pridá do 50 µl bunkovej suspenzie v jamkách 96-jamkovej čiernej mikrotitračnej platničky s plochým dnom. Každá koncentrácia jednotlivých testovaných chemikálií sa testuje v 4 jamkách. Vzorky sa potom premiešajú na trepačke mikrotitračných platničiek a inkubujú sa 16 hodín pri teplote 37 °C a pri 5 % CO_2. Potom sa zmeria aktivita luciferázy podľa opisu uvedeného ďalej.

21. Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla je zmes X-VIVO™ 15 v objeme 50 µl/jamka a bunkovej suspenzie v RPMI-1 640 s obsahom 10 % FBS v objeme 50 µl/jamka.

22. Odporúčaná pozitívna kontrola je 4-NBB. Pripraví sa 20 mg 4-NBB v skúmavke mikroodstredivky s objemom 1,5 ml, do ktorej sa pridá X-VIVO™ 15 do objemu 1 ml. Skúmavka sa intenzívne premiešava a pretrepáva na rotátore maximálnou rýchlosťou 8 ot./min. najmenej 30 minút. Po centrifugácii pri 20 000 g počas 5 minút sa supernatant zriedi faktorom 4 s X-VIVO™ 15 a 500 µl zriedeného supernatantu sa prenesie do jamky na 96-jamkovom skúšobnom bloku. Zriedený supernatant sa ďalej riedi s X-VIVO™ 15 faktormi 2 a 4 a 50 µl tohto roztoku sa pridá do 50 µl bunkovej suspenzie THP-G8 v jamkách 96-jamkovej čiernej mikrotitračnej platničky s plochým dnom (dodatok 3.6). Každá koncentrácia pozitívnej kontroly sa testuje v 4 jamkách. Platnička sa premieša na trepačke mikrotitračných platničiek a inkubuje sa 16 hodín v inkubátore s atmosférou s obsahom CO_2 (37 °C, 5 % CO_2). Potom sa zmeria aktivita luciferázy podľa opisu v odseku 29.

23. Odporúčaná negatívna kontrola je LA. Pripraví sa 20 mg LA v skúmavke mikroodstredivky s objemom 1,5 ml, do ktorej sa pridá X-VIVO™ 15 do objemu 1 ml (20 mg/ml). 20 mg/ml roztoku LA sa zriedi faktorom 5 s X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); 500 µl tohto roztoku LA s koncentráciou 4 mg/ml sa prenesie do jamky na 96-jamkovom skúšobnom bloku. Tento roztok sa zriedi faktorom 2 s X-VIVO™ 15 a potom sa znova zriedi faktorom 2, aby vznikli roztoky s koncentráciou 2 mg/ml a 1 mg/ml. 50 µl týchto 3 roztokov a kontroly s nosičom (X-VIVO™ 15) sa pridá do 50 µl bunkovej suspenzie THP-G8 v jamkách 96-jamkovej čiernej mikrotitračnej platničky s plochým dnom. Každá koncentrácia negatívnej kontroly sa testuje v 4 jamkách. Platnička sa premieša na trepačke mikrotitračných platničiek a inkubuje sa 16 hodín v inkubátore s atmosférou s obsahom CO_2 (37 °C, 5 % CO_2). Potom sa zmeria aktivita luciferázy podľa opisu v odseku 29.

24. Použiť možno iné vhodné pozitívne alebo negatívne kontroly, ak sú k dispozícii historické údaje na odvodenie kritérií prijateľnosti porovnateľných testovacích cyklov.

25. Treba dbať na to, aby sa zabránilo vyparovaniu prchavých testovaných chemikálií a krížovej kontaminácii testovanými chemikáliami medzi jamkami, napr. hermetickým uzatvorením mikrotitračnej platničky pred inkubáciou s testovanými chemikáliami.

26. V prípade testovaných chemikálií a kontroly s aplikáciou rozpúšťadla sa vyžadujú 2 až 4 testovacie cykly na odvodenie pozitívnej alebo negatívnej prognózy (pozri tabuľku 2). Každý testovací cyklus sa vykoná v iný deň s čerstvým zásobným roztokom X-VIVO™ 15 s testovanými chemikáliami a s nezávisle odobratými bunkami. Bunky môžu pochádzať z rovnakej pasáže.

▼M8

Merania aktivity luciferázy

27. Luminiscencia sa meria pomocou luminometra pre 96-jamkovú mikrotitračnú platničku, ktorý je vybavený optickými filtrami, napr. radu Phelios (ATTO, Tokio, Japonsko), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Nemecko) a ARVO (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA). Luminometer je potrebné pre každý test kalibrovať, aby sa zabezpečila reprodukovateľnosť (19). Na účely tejto kalibrácie sú k dispozícii rekombinantné luciferázy emitujúce oranžové a červené svetlo.

28. Do jednotlivých jamiek na mikrotitračnej platničke, ktorá obsahuje bunkovú suspenziu ošetrenú alebo neošetrenú chemikáliou, sa prenesie 100 µl zahriateho reagentu Tripluc® na skúšku s luciferázou (Tripluc). Mikrotitračná platnička sa 10 minút pretrepáva pri teplote okolia približne 20 °C. Mikrotitračná platnička sa umiestni do luminometra s cieľom zmerať aktivitu luciferázy. Bioluminiscencia sa meria počas 3 sekúnd bez prítomnosti (F0) a počas 3 sekúnd v prítomnosti (F1) optického filtra. Použitie alternatívnych nastavení je potrebné odôvodniť, napr. v závislosti od použitého modelu luminometra.

29. Parametre jednotlivých koncentrácií sa vypočítajú z nameraných hodnôt, napr. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, stredná hodnota ± SD IL8LA, stredná hodnota ± SD GAPLA, stredná hodnota ± SD nIL8LA, stredná hodnota ± SD Ind-IL8LA, stredná hodnota ± SD Inh-GAPLA a 95 % interval spoľahlivosti Ind-IL8LA. Vymedzenia parametrov použitých v tomto odseku sa uvádzajú v dodatkoch 3.1 a 3.4.

30. Pred meraním sa rozlišovanie farieb vo viacfarebných reportérových skúškach vo všeobecnosti dosahuje pomocou detektorov (luminometra a snímača mikrotitračných platničiek), ktoré sú vybavené optickými filtrami, napríklad filtrami s ostrým ohraničením (prepúšťajúcimi dlhé alebo krátke vlnové dĺžky) alebo filtrami s pásmovým priepustom. Pred testovaním je potrebné kalibrovať koeficienty prenosu filtrov pre jednotlivé bioluminiscenčné signálne farby podľa dodatku 3.2.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Hodnotenie údajov

31. Z hľadiska kritérií na rozhodnutie o klasifikácii látky ako pozitívnej alebo negatívnej sa vyžaduje, aby v každom testovacom cykle platilo, že:

— prognóza skúšky IL-8 Luc sa považuje za pozitívnu, ak má testovaná chemikália hodnotu Ind-IL8LA ≥ 1,4 a dolný limit 95 % intervalu spoľahlivosti Ind-IL8LA ≥ 1,0,

— prognóza skúšky IL-8 Luc sa považuje za negatívnu, ak má testovaná chemikália hodnotu Ind-IL8LA < 1,4 a/alebo dolný limit 95 % intervalu spoľahlivosti Ind-IL8LA < 1,0.

Prognostický model

32. Testované chemikálie, pri ktorých sa dosiahnu dva pozitívne výsledky spomedzi 1., 2., 3. alebo 4. testovacieho cyklu, sa považujú za pozitívne, zatiaľ čo chemikálie, pri ktorých sa dosiahnu tri negatívne výsledky spomedzi 1., 2., 3. alebo 4. testovacieho cyklu sa považujú za pravdepodobne negatívne (tabuľka 2). Spomedzi pravdepodobne negatívnych chemikálií sa chemikálie rozpustené v X-VIVO^{TM} 15 pri koncentrácii 20 mg/ml považujú za negatívne, zatiaľ čo chemikálie nerozpustné v X-VIVO^{TM} 15 pri koncentrácii 20 mg/ml sa nemajú brať do úvahy (obrázok 1).

▼M8

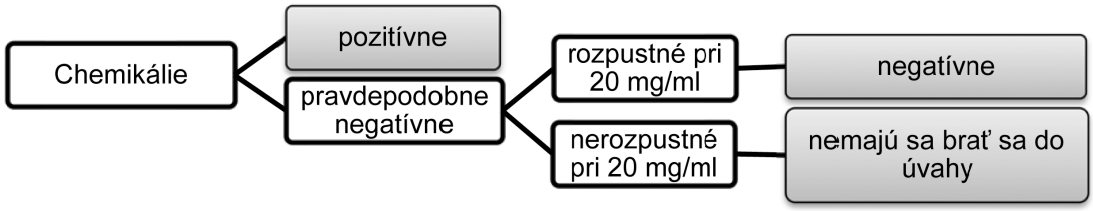
Tabuľka 2

Kritériá na identifikovanie pozitívnych a pravdepodobne negatívnych látok

1. testovací cyklus	2. testovací cyklus	3. testovací cyklus	4. testovací cyklus	Konečná prognóza
pozitívne	pozitívne	—	—	pozitívne
	negatívne	pozitívne	—	pozitívne
		negatívne	pozitívne	pozitívne
			negatívne	pravdepodobne negatívne
negatívne	pozitívne	pozitívne	—	pozitívne
		negatívne	pozitívne	pozitívne
			negatívne	pravdepodobne negatívne
	negatívne	pozitívne	pozitívne	pozitívne
			negatívne	pravdepodobne negatívne
		negatívne	—	pravdepodobne negatívne

Obrázok 1

Prognostický model pre konečné rozhodnutie



Kritériá prijateľnosti

33. Pri použití skúšky IL-8 Luc majú byť splnené tieto kritériá prijateľnosti:

— Hodnota Ind-IL8LA má byť vyššia ako 5,0 najmenej pri jednej koncentrácii pozitívnej kontroly, 4-NBB, v každom testovacom cykle.

— Hodnota Ind-IL8LA má byť nižšia ako 1,4 pri každej koncentrácii negatívnej kontroly, kyseliny mliečnej, v každom testovacom cykle.

— Zamietnu sa údaje z mikrotitračných platničiek, pri ktorých hodnota GAPLA kontrolných jamiek s bunkami a reagentom Tripluc, ale bez chemikálií predstavuje menej ako päťnásobok hodnoty jamky obsahujúcej len testovacie rastové médium (RPMI-1 640 s obsahom 10 % FBS v objeme 50 µl/jamka a X-VIVO™ 15 v objeme 50 µl/jamka).

— Zamietnu sa údaje z mikrotitračných platničiek, pri ktorých je hodnota Inh-GAPLA všetkých koncentrácií testovaných alebo kontrolných chemikálií nižšia ako 0,05. V takom prípade je potrebné zopakovať prvý test tak, aby najvyššia konečná koncentrácia opakovaného testu predstavovala najnižšiu konečnú koncentráciu predchádzajúceho testu.

▼M8

Správa o teste

34. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testované chemikálie

Jednozložkové látky:

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode, molekulová hmotnosť a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,

— rozpustnosť v X-VIVO™ 15. V prípade chemikálií nerozpustných v X-VIVO™ 15 sa uvádza, či sa po centrifugácii pozoruje zrážanie alebo flotácia,

— testované koncentrácie,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu, ak sa nepoužilo X-VIVO™ 15.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— čo najpodrobnejšia charakterizácia, napr. prostredníctvom chemickej identity (pozri vyššie), čistoty, kvantitatívneho výskytu a relevantných fyzikálno-chemických vlastností (pozri vyššie) zložiek v dostupnom rozsahu,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu,

— molekulová hmotnosť alebo relatívna molekulová hmotnosť v prípade zmesí/polymérov známeho zloženia alebo iné informácie potrebné na vykonanie štúdie,

— úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,

— rozpustnosť v X-VIVO™ 15. V prípade chemikálií nerozpustných v X-VIVO™ 15 sa uvádza, či sa po centrifugácii pozoruje zrážanie alebo flotácia,

— testované koncentrácie,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu, ak sa nepoužilo X-VIVO™ 15.

Kontroly

Pozitívna kontrola:

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode, molekulová hmotnosť a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu a podľa potreby,

▼**M8**

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,

— testované koncentrácie, podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— v uplatniteľnom prípade odkaz na historické výsledky pre pozitívne kontroly dokazujúce vhodné kritériá prijateľnosti.

— Negatívna kontrola:

identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS a/alebo iné identifikátory,

— čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

— fyzický vzhľad, molekulová hmotnosť a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v prípade,

— že sa použijú iné negatívne kontroly ako tie uvedené v usmernení na vykonávanie testov, a to v dostupnom rozsahu,

— podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla pre každú testovanú chemikáliu.

Podmienky testu

— meno a adresa objednávateľa, testovacieho zariadenia a vedúceho štúdie,

— opis použitého testu,

— použitá bunková línia, podmienky jej skladovania a zdroj (napr. zariadenie, z ktorého bola získaná),

— číslo šarže a pôvod FBS, názov dodávateľa, číslo šarže 96-jamkovej čiernej mikrotitračnej platničky s plochým dnom a číslo šarže reagentu Tripluc,

— počet pasáží a hustota buniek použitá pri testovaní,

— metóda stanovenia počtu buniek používaná na naočkovanie pred testovaním a opatrenia, ktorými sa zaručí rovnomerné rozdelenie buniek,

— použitý luminometer (napr. model) vrátane jeho nastavenia, použitý substrát luciferázy a preukázanie adekvátnych meraní luminiscencie založených na kontrolnom teste opísanom v dodatku 3.2,

— postup použitý na preukázanie spôsobilosti laboratória vykonávať daný test (napr. testovaním chemikálií na preukázanie spôsobilosti) alebo na preukázanie opakovateľného vykonávania testu v priebehu času.

Testovací postup

— počet replikátov a uskutočnených testovacích cyklov,

— koncentrácie testovaných chemikálií, postup ich použitia a expozičný čas (ak sa líšia od odporúčaných),

▼**M8**

— opis použitých kritérií hodnotenia a rozhodovania,

— opis použitých kritérií prijateľnosti štúdie,

— opis všetkých zmien v testovacom postupe.

Výsledky

— merania hodnôt IL8LA a GAPLA,

— výpočty hodnôt nIL8LA, Ind-IL8LA a Inh-GAPLA,

— 95 % interval spoľahlivosti hodnoty Ind-IL8LA,

— graf zobrazujúci krivky závislosti odozvy od dávky z hľadiska indukcie aktivity luciferázy a životaschopnosti,

— v uplatniteľnom prípade opis všetkých relevantných pozorovaní.

Rozbor výsledkov

— rozbor dosiahnutých výsledkov pri skúške IL-8 Luc,

— posúdenie výsledkov skúšky v kontexte IATA, ak sú k dispozícii iné relevantné informácie.

Záver

LITERATÚRA

(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. K dispozícii na adrese: 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. K dispozícii na adrese: 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. K dispozícii na adrese: 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. K dispozícii na adrese: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, K dispozícii na adrese: 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. K dispozícii na adrese: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

▼**M8**

Dodatok 3.1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: miera zhody výsledkov testu s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o mieru výkonnosti testu a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testu (16).

AOP (dráha nepriaznivého účinku): sled udalostí od chemickej štruktúry cieľovej chemikálie alebo skupiny podobných chemikálií cez molekulárnu iniciačnú udalosť až po výsledok *in vivo*, ktorý je predmetom záujmu (20).

Chemikália: látka alebo zmes.

CV05: životaschopnosť buniek 05, t. j. minimálna koncentrácia, pri ktorej majú chemikálie hodnotu Inh-GAPLA nižšiu ako 0,05.

FInSLO-LA: skratka používaná na označenie hodnoty Ind-IL8LA v správe o validácii a predchádzajúcich publikáciách týkajúcich sa skúšky IL-8 Luc. Pozri vymedzenie pojmu Ind-IL8LA.

GAPLA: aktivita luciferázy v prípade stabilnej luciferázy emitujúcej červené svetlo (SLR) (λmax = 630 nm), ktorú reguluje promótor GAPDH a ktorá preukazuje životaschopnosť buniek a počet životaschopných buniek.

Nebezpečnosť: inherentná vlastnosť činidla, prípadne situácia, ktorá môže vyvolať nepriaznivé účinky pri expozícii organizmu, systému alebo (sub)populácie účinkom daného činidla.

IATA (integrovaný prístup k testovaniu a hodnoteniu): štruktúrovaný prístup používaný na identifikáciu (potenciálnej) nebezpečnosti, charakterizáciu nebezpečnosti (z hľadiska potencie) a/alebo hodnotenie bezpečnosti (potenciál/potencia a expozícia) chemikálie alebo skupiny chemikálií, ktorý strategicky integruje a porovnáva všetky relevantné údaje v záujme prijatia regulačného rozhodnutia o potenciálnej nebezpečnosti a/alebo riziku a/alebo potrebe vykonania ďalších cielených, t. j. minimálnych testov.

II-SLR-LA: skratka používaná na označenie hodnoty Inh-GAPLA v správe o validácii a predchádzajúcich publikáciách týkajúcich sa skúšky IL-8 Luc. Pozri vymedzenie pojmu Inh-GAPLA.

IL-8 (interleukín-8): cytokín odvodený od endotelových buniek, fibroblastov, keratinocytov, makrofágov a monocytov, ktorý spôsobuje chemotaxiu neutrofilov a T-lymfocytov.

IL8LA: aktivita luciferázy v prípade stabilnej luciferázy emitujúcej oranžové svetlo (SLO) (λmax = 580 nm), ktorú reguluje promótor IL-8.

Ind-IL8LA: násobná indukcia nIL8LA. Získava sa ako podiel hodnoty nIL8LA buniek THP-G8 ošetrených chemikáliami a hodnoty buniek THP-G8 nevystavených stimulácii a vyjadruje indukciu pôsobenia promótora IL-8 spôsobenú chemikáliami.

Inh-GAPLA: inhibícia hodnoty GAPLA. Získava sa ako podiel hodnoty GAPLA buniek THP-G8 ošetrených chemikáliami a hodnoty GAPLA neošetrených buniek THP-G8 a vyjadruje cytotoxicitu chemikálií.

Minimálna hranica indukcie (MIT): najnižšia koncentrácia, pri ktorej chemikália spĺňa kritériá klasifikácie ako pozitívnej látky.

▼M8

Zmes: zmes alebo roztok zložený z dvoch alebo viacerých látok.

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej 80 hm. %.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna z hlavných zložiek zastúpená v koncentrácii ≥ 10 hm. % a < 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo k chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

nIL8LA: aktivita luciferázy SLO odrážajúca pôsobenie promótora IL-8 (IL8LA) normalizovaná na základe aktivity luciferázy SLR odrážajúcej pôsobenie promótora GAPDH (GAPLA). Vyjadruje pôsobenie promótora IL-8 po zohľadnení životaschopnosti buniek alebo počtu buniek.

nSLO-LA: skratka používaná na označenie hodnoty nIL8LA v správe o validácii a predchádzajúcich publikáciách týkajúcich sa skúšky IL-8 Luc. Pozri vymedzenie pojmu nIL8LA.

Pozitívna kontrola: replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému a ošetrený látkou, ktorá je známa tým, že vyvoláva pozitívnu reakciu. Aby bolo možné vyhodnotiť variabilitu reakcie na pozitívnu kontrolu v čase, nesmie byť rozsah pozitívnej reakcie nadmerne veľký.

Pre-haptény: chemikálie, ktoré sa stávajú senzibilizátormi prostredníctvom abiotickej transformácie.

Pro-haptény: chemikálie, pri ktorých sa vyžaduje enzymatická aktivácia na to, aby vznikol potenciál kožnej senzibilizácie.

Relevantnosť: opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej sa testom správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testu (16).

Spoľahlivosť: miera rozsahu, v rámci ktorého sa môže test počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Hodnotí sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a vnútrolaboratórnej opakovateľnosti (16).

Testovací cyklus: testovací cyklus pozostáva z jednej alebo viacerých testovaných chemikálií testovaných súbežne s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla/kontrolou s nosičom a s pozitívnou kontrolou.

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testu, ktorý poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testu (16).

SLO-LA: skratka používaná na označenie hodnoty IL8LA v správe o validácii a predchádzajúcich publikáciách týkajúcich sa skúšky IL-8 Luc. Pozri vymedzenie pojmu IL8LA.

SLR-LA: skratka používaná na označenie hodnoty GAPLA v správe o validácii a predchádzajúcich publikáciách týkajúcich sa skúšky IL-8 Luc. Pozri vymedzenie pojmu GAPLA.

▼M8

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom: neošetrená vzorka obsahujúca všetky zložky testovacieho systému okrem testovanej chemikálie, ale vrátane použitého rozpúšťadla/nosiča. Slúži na stanovenie základnej reakcie vzoriek ošetrených testovanou chemikáliou rozpustenou alebo stabilne rozmiešanou v rovnakom rozpúšťadle/nosiči. Keď sa táto vzorka testuje so súbežnou kontrolou s rastovým médiom, preukáže sa aj to, či rozpúšťadlo/nosič a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testu, ktorý poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testu (16).

Látka: chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie ich stability a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ktorý však nezahŕňa žiadne rozpúšťadlá, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo zmeny jej zloženia.

Povrchovo aktívna látka: takisto nazývaná surfaktant, je látka, ako napríklad detergent, ktorá dokáže znížiť povrchové napätie kvapaliny a tak jej umožniť penenie alebo prenikanie do tuhých látok. Nazýva sa aj zvlhčujúce činidlo (TG437).

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto metódy.

THP-G8: reportérová bunková línia IL-8, ktorá sa používa v skúške IL-8 Luc. Ľudská bunková línia THP-1 podobná makrofágom bola transfektovaná pomocou génu luciferázy SLO riadeného promótorom IL-8 a génu luciferázy SLR riadeného promótorom GAPDH.

Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií OSN (GHS OSN): systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálnej, zdravotnej a environmentálnej nebezpečnosti a ich označovanie zodpovedajúcimi komunikačnými prvkami, ako sú piktogramy, výstražné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o nepriaznivých účinkoch daných chemikálií v záujme ochrany osôb (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a subjektov reakcie na núdzové situácie) a životného prostredia (21).

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

Platná testovacia metóda: test, ktorý sa na daný účel považuje za dostatočne relevantný a spoľahlivý a ktorý je založený na vedecky podložených zásadách. Test nie je nikdy platný v absolútnom zmysle, ale len vo vzťahu k vymedzenému účelu.

▼**M8**

Dodatok 3.2

PRINCÍP MERANIA AKTIVITY LUCIFERÁZY A STANOVENIE KOEFICIENTOV PRENOSU OPTICKÉHO FILTRA PRE SLO A SLR

Systém viacnásobnej reportérovej skúšky – Tripluc – možno použiť s luminometrom pre mikrotitračnú platničku so systémom detekcie viacerých farieb, ktorý umožňuje použitie optického filtra [napr. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)]. Optický filter použitý pri meraní je filter prepúšťajúci dlhé alebo krátke vlnové dĺžky v rozsahu 600 – 620 nm alebo filter s pásmovým priepustom v rozsahu 600 – 700 nm.

Meranie luciferáz s dvomi farbami pomocou optického filtra

V tomto príklade sa používa model Phelios AB-2350 (ATTO). Tento luminometer je vybavený 600 nm filtrom prepúšťajúcim dlhé vlnové dĺžky (LP) (R60 HOYA Co., 600 nm LP, filter 1) na rozklad luminiscencie SLO (λmax = 580 nm) a SLR (λmax = 630 nm).

S cieľom stanoviť koeficienty prenosu pre 600 nm filter LP najskôr pomocou čistených enzýmov luciferázy SLO a SLR zmerajte i) intenzitu bioluminiscencie SLO a SLR bez filtra (F0); ii) intenzitu bioluminiscencie SLO a SLR pri prechode cez 600 nm filter LP (filter 1) a iii) vypočítajte koeficienty prenosu 600 nm filtra LP pre SLO a SLR uvedené ďalej.

Koeficienty prenosu		Skratka	Definícia
SLO	koeficienty prenosu filter 1	κO_{R60}	koeficient prenosu filtra pre SLO
SLR	koeficienty prenosu filter 1	κR_{R60}	koeficient prenosu filtra pre SLR

Ďalej je opísaná i) intenzita svetla bez filtra (úplný optický prenos) F0 a ii) intenzita svetla pri prechode cez 600 nm filter LP (filter 1) F1, pričom intenzita SLO v testovacej vzorke je vymedzená ako O a intenzita SLR je vymedzená ako R.

$F0 = O + R$

$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Tieto vzorce možno preformulovať takto:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Pomocou vypočítaných faktorov priepustnosti (κO_{R60} a κR_{R60}) a nameraných hodnôt F0 a F1 možno vypočítať hodnoty O a R takto:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

▼M8

Materiály a metódy na určenie faktora priepustnosti

1. *Reagenty*

Jednotlivé čistené enzýmy luciferázy:

lyofilizovaný čistený enzým SLO,

lyofilizovaný čistený enzým SLR,

(ktoré sa na účely validácie získali z laboratória GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonsko s využitím bunkovej línie THP-G8).

Skúšobný reagent:

reagent Tripluc® na skúšku s luciferázou (napríklad od spoločnosti TOYOBO kat. č. MRA-301).

Rastové médium: pre skúšku s luciferázou (30 ml, skladované pri teplote 2 – 8 °C).

Reagent	Konc.	Konečná koncentrácia v rastovom médiu	Požadované množstvo
RPMI-1640	—	—	27 ml
FBS	—	10 %	3 ml

2. *Príprava enzymatického roztoku*

Rozpustite lyofilizovaný čistený enzým luciferázy v skúmavke pridaním 200 µl Tris/HCl alebo Hepes/HCl s koncentráciou 10 ~ 100 mM (pH 7,5 ~ 8,0) doplneného glycerolom s koncentráciou 10 % (hm./obj.), rozdeľte enzymatický roztok na 10 µl alikvotné časti v jednorazových skúmavkách s objemom 1,5 ml a uskladnite ich v mrazničke pri teplote –80 °C. Zmrazený enzymatický roztok možno používať až 6 mesiacov. Pri použití do každej skúmavky obsahujúcej enzymatické roztoky (zriedený enzymatický roztok) pridajte 1 ml rastového média pre skúšku s luciferázou (RPMI-1640 s 10 % FBS) a uchovávajte ich na ľade, aby sa predišlo deaktivácii.

3. *Meranie bioluminiscencie*

Reagent Tripluc® na skúšku s luciferázou rozmrazte a uchovávajte pri izbovej teplote vo vodnom kúpeli alebo pri teplote okolia. Luminometer zapnite 30 minút pred začiatkom merania, aby došlo k stabilizácii fotonásobiča. Preneste 100 µl zriedeného enzymatického roztoku do čiernej 96-jamkovej mikrotitračnej platničky (s plochým dnom) (referenčnú vzorku SLO do jamiek B1, B2, B3, referenčnú vzorku SLR do jamiek D1, D2, D3). Potom pomocou pipety preneste 100 µl zahriateho reagentu Tripluc do každej jamky na mikrotitračnej platničke, ktorá obsahuje zriedený enzymatický roztok. Pomocou trepačky mikrotitračných platničiek pretrepávajte mikrotitračnú platničku 10 minút pri izbovej teplote (približne 25 °C). Ak sa v roztokoch v jamkách objavia bubliny, odstráňte ich. Umiestnite mikrotitračnú platničku do luminometra a odmerajte aktivitu luciferázy. Bioluminiscencia sa meria počas 3 sekúnd bez prítomnosti (F0) a počas 3 sekúnd v prítomnosti (F1) optického filtra.

Koeficient prenosu optického filtra sa vypočítal takto:

Koeficient prenosu [SLO (κO_{R60})] = (B1 s F1 + B2 s F1 + B3 s F1) / (B1 s F0 + B2 s F0 + B3 s F0)

▼**M8**

Koeficient prenosu [SLR (κR_{R60})] = (D1 s F1 + D2 s F1 + D3 s F1) / (D1 s F0 + D2 s F0 + D3 s F0)

Vypočítané faktory prenosu sa používajú pre všetky merania uskutočnené pomocou toho istého luminometra.

Kontrola kvality zariadenia

Použijú sa postupy opísané v protokole skúšky IL-8 Luc (18).

▼**M8**

Dodatok 3.3

LÁTKY NA PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

Pred rutinným použitím testu opísaného v tomto dodatku k testovacej metóde B.71 by mali laboratóriá preukázať technickú spôsobilosť tým, že získajú očakávanú prognózu výsledku skúšky IL-8 Luc v prípade 9 chemikálií odporúčaných v tabuľke 1 a získajú hodnoty, ktoré patria do príslušného referenčného rozsahu pre najmenej 8 z 9 látok na preukázanie spôsobilosti (vybraných tak, aby reprezentovali rozsah reakcií z hľadiska nebezpečenstva kožnej senzibilizácie). Medzi ďalšie výberové kritériá patrilo to, aby boli látky komerčne dostupné a aby boli dostupné referenčné údaje *in vivo* s vysokou kvalitou, ako aj údaje *in vitro* s vysokou kvalitou vygenerované pomocou skúšky IL-8 Luc. Pre skúšku IL-8 Luc sú k dispozícii aj publikované referenčné údaje (6) (1).

Tabuľka 1

Odporúčané látky na preukazovanie technickej spôsobilosti pri skúške IL-8 Luc

Látky na preukázanie spôsobilosti	Číslo CAS	Skupenstvo	Rozpustnosť v X-VIVO 15 pri 20 mg/ml	Prognóza *in vivo* (1)	Prognóza skúšky IL-8 Luc (2)	Referenčný rozsah (µg/ml) (3)	
						CV_{05} (4)	IL-8 Luc MIT (5)
2,4-dinitrochlórbenzén	97-00-7	tuhé	nerozpustné	senzibilizátor (extrémny)	pozitívne	2,3 – 3,9	0,5 – 2,3
formaldehyd	50-00-0	kvapalné	rozpustné	senzibilizátor (silný)	pozitívne	9 – 30	4 – 9
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	tuhé	nerozpustné	senzibilizátor (mierny)	pozitívne	250 – 290	60 – 250
etyléndiamín	107-15-3	kvapalné	rozpustné	senzibilizátor (mierny)	pozitívne	500 – 700	0,1 – 0,4
etylénglykol-dimetakrylát	97-90-5	kvapalné	nerozpustné	senzibilizátor (slabý)	pozitívne	> 2 000	0,04 – 0,1
4-alylanizol (estragol)	140-67-0	kvapalné	nerozpustné	senzibilizátor (slabý)	pozitívne	> 2 000	0,01 – 0,07
streptomycín sulfát	3810-74-0	tuhé	rozpustné	nespôsobuje senzibilizáciu	negatívne	> 2 000	> 2 000
glycerol	56-81-5	kvapalné	rozpustné	nespôsobuje senzibilizáciu	negatívne	> 2 000	> 2 000
izopropanol	67-63-0	kvapalné	rozpustné	nespôsobuje senzibilizáciu	negatívne	> 2 000	> 2 000

Skratky: Číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service)
(1) Potencia *in vivo* je odvodená pomocou kritérií navrhnutých organizáciou ECETOC (19).
(2) Na základe hodnôt pozorovaných v minulosti (1) (6).
(3) Hodnoty CV_{05} a IL-8 Luc MIT sa vypočítali na základe rozpustnosti vo vode podľa softvéru EPI Suite™.
(4) CV_{05}: minimálna koncentrácia, pri ktorej majú chemikálie hodnotu Inh-GAPLA nižšiu ako 0,05.
(5) MIT: najnižšia koncentrácia, pri ktorej chemikália spĺňa kritériá klasifikácie ako pozitívnej látky.

▼M8

Dodatok 3.4

INDEXY A KRITÉRIÁ POSUDZOVANIA

nIL8LA (nSLO-LA)

J-té opakovanie (j = 1 – 4) i-tej koncentrácie (i = 0 – 11) sa meria pre IL8LA (SLO-LA), resp. GAPLA (SLR-LA). Normalizovaná hodnota IL8LA sa označuje ako nIL8LA (nSLO-LA) a je vymedzená ako:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Je to základná jednotka merania v tejto skúške.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Ind-IL8LA, t. j. násobné zvýšenie spriemerovanej hodnoty nIL8LA (nSLO-LA) pre opakovanie pri i-tej koncentrácii, ktoré sa porovnáva s hodnotou pri koncentrácii 0, predstavuje hlavnú meranú hodnotu v tejto skúške. Tento pomer je vyjadrený týmto vzorcom:

$$Ind - IL8LA_i = \left\{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j}\right\}$$

Podľa návrhu vedúceho laboratória zodpovedá hodnota 1,4 pozitívnemu výsledku testovanej chemikálie. Táto hodnota je stanovená na základe skúmania historických údajov vedúceho laboratória. Tím pre správu údajov následne používal túto hodnotu vo všetkých fázach validačnej štúdie. Hlavný výsledok, Ind-IL8LA, predstavuje pomer dvoch aritmetických priemerov, ako sa uvádza v rovnici.

95 % interval spoľahlivosti (95 % CI)

Na vyjadrenie presnosti hlavnej výslednej hodnoty možno vykonať odhad 95 % intervalu spoľahlivosti (95 % CI) na základe uvedeného pomeru. Keď je dolný limit 95 % CI ≥ 1, označuje to, že hodnota nIL8LA s i-tou koncentráciou je významne vyššia ako príslušná hodnota s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla. Na stanovenie 95 % CI existuje niekoľko spôsobov. V rámci tejto štúdie sa použila metóda známa pod označením Fiellerova teoréma. Táto teoréma 95 % intervalu spoľahlivosti sa získala z tohto vzorca:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}\right],$$

keď

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$$

$$C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$$

▼**M8**

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \bar{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2$

predstavuje 97,5. percentil centrálnej distribúcie t s hodnotou ν stupňa voľnosti, keď

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Hodnota Inh-GAPLA predstavuje pomer spriemerovanej hodnoty GAPLA (SLR-LA) pre opakovanie i-tej koncentrácie v porovnaní s hodnotou pre kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla a vyjadruje sa ako

$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

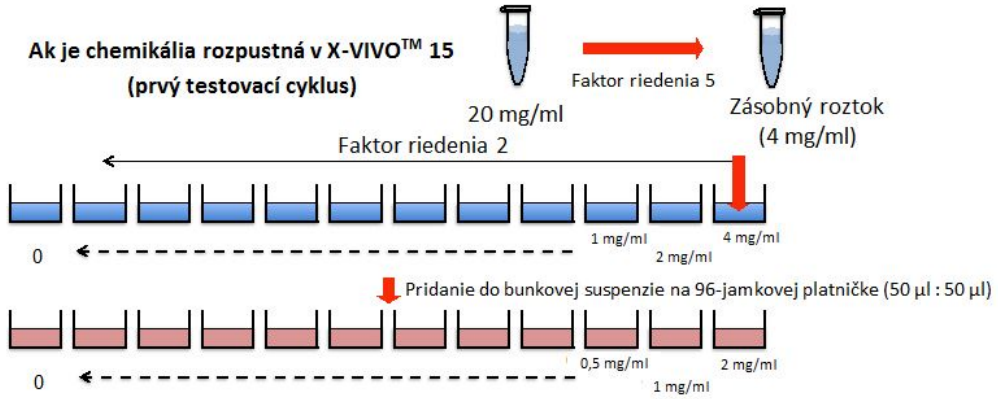
Keďže hodnota GAPLA je menovateľ hodnoty nIL8LA, veľmi malá hodnota spôsobuje veľkú zmenu hodnoty nIL8LA. Hodnoty Ind-IL8LA s mimoriadne malou hodnotou Inh-GAPLA (menej ako 0,05) sa môžu považovať sa prejav nízkej presnosti.

▼**M8**

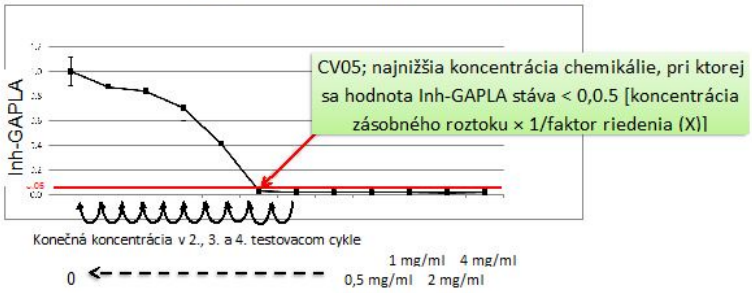
Dodatok 3.5

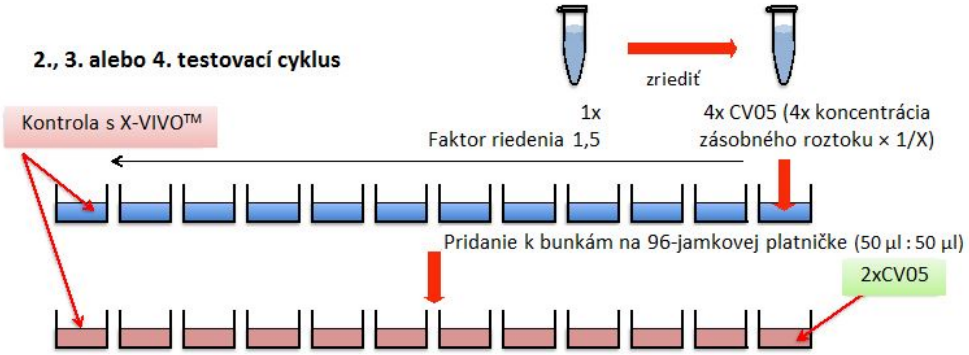
SCHÉMA METÓD NA ROZPUSTENIE CHEMIKÁLIÍ PRE SKÚŠKU IL-8 LUC

a) pre chemikálie rozpustné v X-VIVO™ 15 pri koncentrácii 20 mg/ml



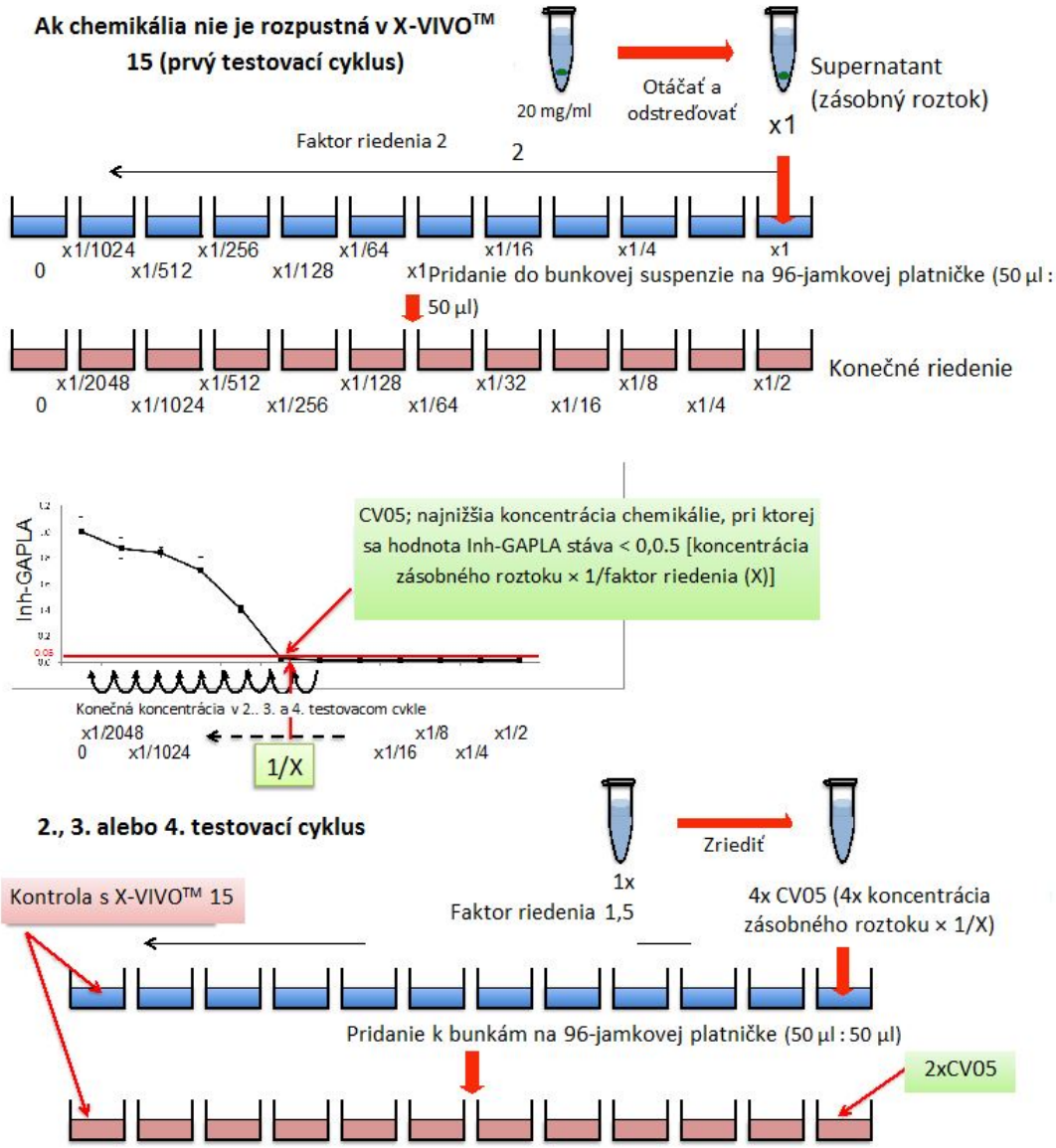
Stanovenie najvyššej koncentrácie v týchto testovacích cykloch





▼**M8**

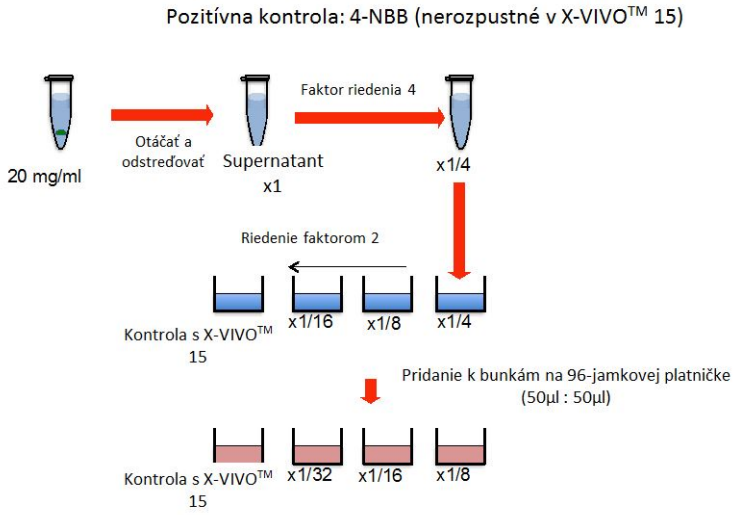
b) pre chemikálie nerozpustné v X-VIVO™ 15 pri koncentrácii 20 mg/ml



▼**M8**

Dodatok 3.6

SCHÉMA METÓDY NA ROZPUSTENIE 4-NBB PRE POZITÍVNU KONTROLU V SKÚŠKE IL-8 LUC



▼B

ČASŤ C: METÓDY NA STANOVENIE EKOTOXICITY

OBSAH

C.1. AKÚTNA TOXICITA NA RYBÁCH

C.2. TEST AKÚTNEJ IMOBILIZÁCIE DAFNIÍ *(DAPHNIA* SP.)

C.3. SLADKOVODNÉ RIASY A SINICE, TEST INHIBÍCIE RASTU

C.4. STANOVENIE „ĽAHKEJ“ BIODEGRADOVATEĽNOSTI

ČASŤ I. VŠEOBECNÉ ÚVAHY

ČASŤ II. ÚBYTOK ROZPUSTENÉHO ORGANICKÉHO UHLÍKA (DOC DIE-AWAY) (metóda C.4-A)

ČASŤ III. MODIFIKOVANÝ SKRÍNINGOVÝ TEST OECD (metóda C.4-B)

ČASŤ IV. VÝVOJ OXIDU UHLIČITÉHO (CO_2) (metóda C.4-C)

ČASŤ V. TEST MANOMETRICKEJ RESPIROMETRIE (metóda C.4-D)

ČASŤ VI. TEST UZAVRETEJ FĽAŠE (metóda C.4-E)

ČASŤ VII. TEST M.I.T.I. (metóda C.4-F)

C.5. DEGRADÁCIA – BIOCHEMICKÁ SPOTREBA KYSLÍKA

C.6. DEGRADÁCIA – CHEMICKÁ SPOTREBA KYSLÍKA

C.7. DEGRADÁCIA – ABIOTICKÁ DEGRADÁCIA: HYDROLÝZA AKO FUNKCIA pH

C.8. TOXICITA NA DÁŽĎOVKÁCH

C.9. BIODEGRADÁCIA – ZAHN-WELLENSOV TEST

C.10. SIMULAČNÝ TEST AERÓBNEHO ČISTENIA ODPADOVÝCH VÔD C.10-A: JEDNOTKY S TECHNOLÓGIOU AKTIVOVANÉHO KALU – C.10-B: BIOFILMY

C.11. AKTIVOVANÝ KAL, TEST RESPIRAČNEJ INHIBÍCIE (OXIDÁCIA UHLÍKA A AMÓNNYCH IÓNOV)

C.12. BIODEGRADÁCIA – MODIFIKOVANÝ SCAS-TEST

C.13. BIOAKUMULÁCIA U RÝB: EXPOZÍCIA VO VODNOM PROSTREDÍ A Z POTRAVY

C.14. RASTOVÝ TEST MLÁĎAT RÝB

C.15. RYBY, KRÁTKODOBÝ TEST TOXICITY NA EMBRYÁCH A VÝVOJOVOM ŠTÁDIU PLODOVÉHO VAKU

C.16. VČELY OBECNÉ – AKÚTNY TEST ORÁLNEJ TOXICITY

C.17. VČELY OBECNÉ – AKÚTNY TEST TOXICITY KONTAKTOM

C.18. ADSORPCIA ALEBO DESORPCIA S POUŽITÍM ROVNOVÁŽNEJ METÓDY DÁVKOVANIA

▼B

C.19.	ODHAD ADSORPČNÉHO KOEFICIENTU (K_{oc}) V PÔDE A V SPLAŠKOVOM KALE ZA POUŽITIA VYSOKOÚČINNEJ KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE (HPLC)
C.20.	REPRODUKČNÝ TEST NA *DAPHNIA MAGNA*
C.21.	PÔDNE MIKROORGANIZMY: TEST TRANSFORMÁCIE DUSÍKA
C.22.	PÔDNE MIKROORGANIZMY: TRANSFORMAČNÝ TEST UHLÍKA
C.23.	AERÓBNA A ANAERÓBNA TRANSFORMÁCIA V PÔDE
C.24.	AERÓBNA A ANAERÓBNA TRANSFORMÁCIA V SYSTÉMOCH VODA/SEDIMENT
C.25.	AERÓBNA MINERALIZÁCIA V POVRCHOVEJ VODE – SIMULAČNÝ TEST BIODEGRADÁCIE
C.26.	DRUHY RODU *LEMNA*, TEST INHIBÍCIE RASTU
C.27.	TEST TOXICITY CHIRONOMIDAE V SYSTÉME SEDIMENT – VODA ZA POUŽITIA OBOHATENÉHO SEDIMENTU
C.28.	TEST TOXICITY CHIRONOMIDAE V SYSTÉME SEDIMENT – VODA ZA POUŽITIA OBOHATENEJ VODY
C.29.	ĽAHKÁ BIODEGRADOVATEĽNOSŤ – CO_2 V HERMETICKY UZAVRETÝCH NÁDOBÁCH (TEST V UZAVRETOM PRIESTORE NAD KVAPALINOU)
C.30.	BIOAKUMULÁCIA PRI SUCHOZEMSKÝCH MÁLOŠTETINAVCOCH
C.31.	TEST SUCHOZEMSKÝCH RASTLÍN: TEST VZCHÁDZANIA SEMIEN A RASTU SADENÍC
C.32.	REPRODUKČNÝ TEST S ČERVAMI ČEĽADE *ENCHYTRAEIDAE*
C.33.	REPRODUKČNÝ TEST S DÁŽĎOVKAMI (*EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI*)
C.34.	STANOVENIE INHIBÍCIE ČINNOSTI ANAERÓBNYCH BAKTÉRIÍ – ZNÍŽENIE PRODUKCIE PLYNU Z ANAERÓBNE VYHNÍVAJÚCEHO (ČISTIARENSKÉHO) KALU
C.35.	TEST TOXICITY PRE ČERVY RODU *LUMBRICULUS* V SYSTÉME SEDIMENT – VODA ZA POUŽITIA OBOHATENÉHO SEDIMENTU
C.36.	REPRODUKČNÝ TEST S DRAVÝMI ROZTOČMI [*HYPOASPIS ACULEIFER* (*GEOLAELAPS*)] V PÔDE
C.37.	21-DŇOVÝ TEST NA RYBÁCH: KRÁTKODOBÝ SKRÍNING ESTROGÉNNEHO A ANDROGÉNNEHO PÔSOBENIA A INHIBÍCIA AROMATÁZY
C.38.	SKÚŠKA METAMORFÓZY OBOJŽIVELNÍKOV
C.39.	TEST ROZMNOŽOVANIA CHVOSTOSKOKOV V PÔDE

▼B

C.40.	TEST TOXICITY ŽIVOTNÉHO CYKLU *CHIRONOMIDAE* V SYSTÉME SEDIMENT – VODA ZA POUŽITIA OBOHATENEJ VODY ALEBO OBOHATENÉHO SEDIMENTU
C.41.	TEST POHLAVNÉHO VÝVINU RÝB
C.42.	BIODEGRADOVATEĽNOSŤ V MORSKEJ VODE
C.43.	ANAERÓBNA BIODEGRADOVATEĽNOSŤ ORGANICKÝCH LÁTOK VO VYHNITOM KALE: MERANÍM TVORBY PLYNU
C.44.	LÚHOVANIE V PÔDNYCH KOLÓNACH
C.45.	ODHAD EMISIÍ Z DREVA OŠETRENÉHO OCHRANNÝM PROSTRIEDKOM DO ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA: LABORATÓRNA METÓDA PRE DREVENÉ KOMODITY BEZ POVRCHOVEJ ÚPRAVY, KTORÉ SÚ V KONTAKTE SO SLADKOU VODOU ALEBO MORSKOU VODOU
C.46.	BIOAKUMULÁCIA PRI BENTICKÝCH MÁLOŠTETINAVCOCH ŽIJÚCICH V SEDIMENTE
C.47.	TEST TOXICITY V RANOM ŠTÁDIU VÝVOJA RÝB
C.48.	KRÁTKODOBÝ REPRODUKČNÝ TEST NA RYBÁCH
C.49.	TEST AKÚTNEJ TOXICITY NA RYBÍCH EMBRYÁCH (FET)
C.50.	TEST TOXICITY PRE STOLÍSTOK KLASNATÝ (*MYRIOPHYLLUM SPICATUM*) V SYSTÉME BEZ SEDIMENTU
C.51.	TEST TOXICITY PRE *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* V SYSTÉME VODA – SEDIMENT
C.52.	ROZŠÍRENÝ JEDNOGENERAČNÝ REPRODUKČNÝ TEST NA RYŽOVNÍČKE JAPONSKEJ (MEOGRT)
C.53.	SKÚŠKA VÝVOJA A RASTU OBOJŽIVELNÍKOV V LARVÁLNOM ŠTÁDIU (LAGDA)

▼B

C.1. AKÚTNA TOXICITA NA RYBÁCH

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Účelom tohto testu je stanoviť akútnu letálnu toxicitu látky pre ryby v sladkej vode. Tak ako je to len možné, je výhodné mať informácie o rozpustnosti vo vode, tlaku pár, chemickej stabilite, disociačných konštantách a biodegradabilite látky, aby tieto informácie pomohli pri výbere najvhodnejšej skúšobnej metódy (statická, semistatická alebo prietoková), ktorá uspokojivo zaistí konštantné koncentrácie testovanej látky počas testu.

Ďalšie informácie (napr. štruktúrny vzorec, stupeň čistoty, druh a percentuálne zastúpenie nečistôt, prítomnosť a množstvo aditív a rozdeľovaci koeficient n-oktanol/voda) sa tiež berú do úvahy pri plánovaní testu a pri vyhodnotení výsledkov.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Akútna toxicita je rozpoznateľný nepriaznivý účinok indukovaný v organizme počas krátkeho času (dni) expozície látke. V tomto teste je akútna toxicita vyjadrená ako stredná letálna koncentrácia (LC_{50}), čo je taká koncentrácia vo vode, pri ktorej uhynie 50 % rýb z testovaného súboru počas kontinuálnej expozície, ktorá musí byť predtým určená.

Všetky koncentrácie testovanej látky sú uvedené v hmotnosti na objem (mg/liter). Môžu byť tiež vyjadrené ako hmotnosť na hmotnosť ($mg.kg^{-1}$).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky sa môžu testovať na účely demonštrovania, že za laboratórnych skúšobných podmienok nedošlo k významnej zmene reakcie testovaných druhov.

Pre tento test nie sú špecifikované žiadne referenčné látky.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Limitný test možno vykonať pri koncentrácii 100 mg/liter na dôkaz, že hodnota LC_{50} je väčšia ako táto koncentrácia.

Ryby sú exponované testovanej látke pridanej do vody v rozsahu rôznych koncentrácií počas 96 hodín. Úmrtnosť sa zaznamenáva minimálne v 24-hodinových intervaloch, a ak je to možné, koncentrácie spôsobujúce 50 % úmrtnosť rýb (LC_{50}) sa vypočítajú v každom pozorovacom čase.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Kritériá kvality sa aplikujú pri limitnom teste, ako aj pri úplnej skúšobnej metóde.

Úmrtnosť v kontrolách nesmie presiahnuť 10 % (alebo jednu rybu, ak sa použilo menej ako 10 rýb) na konci testu.

Koncentrácia rozpusteného kyslíka musí byť vyššia ako 60 % z celkovej hodnoty pri saturácii vzduchom.

▼B

Koncentrácie testovanej látky sa budú udržiavať v rámci 80 % pôvodných koncentrácií počas celého testu.

Pre látky, ktoré sú ľahko rozpustné v testovacom médiu a ktoré tvoria stabilné roztoky, napríklad tie, ktoré nebudú vo významnej miere prchavé, nebudú sa rozkladať, hydrolyzovať ani adsorbovať, ich počiatočná koncentrácia sa môže považovať za ekvivalentnú k nominálnej koncentrácii. Musí byť dokázané, že koncentrácie sa udržiavali počas celého testu a kritériá kvality sa dodržali.

Pre látky, ktoré sú:

i) slabo rozpustné v testovacom médiu alebo

ii) schopné vytvárať stabilné emulzie alebo disperzie, alebo

iii) nestabilné vo vodných roztokoch,

počiatočná koncentrácia sa bude považovať za koncentráciu meranú v roztoku (alebo ak to nie je technicky možné, meranú vo vodnom stĺpci) na začiatku testu. Koncentrácia sa stanoví až po vytvorení rovnováhy, ale pred použitím testovaných rýb.

Vo všetkých týchto prípadoch sa musia vykonať ďalšie merania počas testu, aby sa potvrdili aktuálne expozičné koncentrácie alebo aby sa dodržali kritériá kvality.

Hodnota pH by sa nemala meniť viac ako v rozsahu jednej jednotky.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

Môžu sa použiť tri typy postupov:

Statický test:

Test toxicity, v ktorom nedochádza k žiadnemu toku testovaného roztoku. (Roztoky zostávajú nezmenené počas trvania testu.)

Semistatický test:

Test bez toku testovaného roztoku, ale s pravidelnými obnoveniami testovaných roztokov po určitom období (napr. 24 hodinách).

Prietokový test:

Test toxicity, v ktorom sa voda neustále obnovuje v skúšobných komorách a testovaná látka alebo prípravok sa transportuje vodou používanou na obnovu skúšobného média.

1.6.1. **Reagenty**

1.6.1.1. *Roztoky testovaných látok*

Zásobné roztoky požadovanej sily sa pripravia rozpustením látky v deionizovanej vode alebo vode podľa 1.6.1.2.

Zvolené koncentrácie na testovanie sa pripravia zriedením zásobného roztoku. Ak sa testujú vysoké koncentrácie, potom sa látka môže rozpustiť priamo vo vode.

▼B

Látky by sa normálne mali testovať len po limit rozpustnosti. Pri niektorých látkach (napr. látky s nízkou rozpustnosťou vo vode alebo vysokou hodnotou P_{OW} alebo tie, ktoré sú schopné tvoriť stabilné disperzie namiesto pravých roztokov vo vode) je prijateľné testovať koncentrácie nad limitom rozpustnosti látky, aby sa zaistilo, že bola dosiahnutá maximálna rozpustná/stabilná koncentrácia. Avšak je dôležité, aby táto koncentrácia nejakým spôsobom nenarušovala testovací systém (napr. film látky na povrchu vody, ktorý bráni oxidácii vody atď.).

Ultrazvuková disperzia, organické rozpúšťadlá, emulzifikátory alebo dispergujúce látky možno použiť ako pomôcku pri príprave zásobných roztokov látok s nízkou rozpustnosťou vo vode alebo ako pomôcku pri dispergovaní týchto látok v testovacom médiu. Keď sa použijú takéto pomocné látky, potom všetky testované koncentrácie majú obsahovať rovnaké množstvo pomocnej látky a mala by sa vykonať dodatočná kontrola, pri ktorej sú ryby vystavené rovnakej koncentrácii pomocnej látky, aká je použitá v skúšobných sériách. Koncentrácia takýchto pomocných látok by mala byť minimalizovaná, ale v žiadnom prípade by nemala presahovať 100 mg/liter skúšobného média.

Test je potrebné vykonať bez úpravy pH. Ak dochádza k výraznej zmene pH, odporúča sa, aby sa test zopakoval s úpravou pH a výsledky sa zaznamenali. V takomto prípade by sa nemala úprava pH hodnoty zásobného roztoku podľa pH hodnoty vodného roztoku, pokiaľ na to nie je špeciálny dôvod, urobiť. Na tento účel sa odporúča HCl a NaOH. Nadstavenie pH hodnoty je potrebné vykonať takým spôsobom, aby sa koncentrácia testovanej látky v zásobnom roztoku významne nezmenila. Akúkoľvek chemickú reakciu alebo fyzikálnu precipitáciu testovanej látky alebo prípravku počas úpravy hodnoty pH je potrebné uviesť v záznamoch v správe z testu.

1.6.1.2. *Voda pre chov rýb a na riedenie*

Môže sa použiť pitná voda (nekontaminovaná potenciálne škodlivou koncentráciou chlóru, ťažkými kovmi alebo inými látkami), prírodná voda dobrej kvality alebo rekonštituovaná voda (pozri dodatok I). Odporúča sa použiť vodu s celkovou tvrdosťou v rozsahu 10 až 250 mg/liter (ako $CaCO_3$) a s pH hodnotou v rozmedzí 6,0 až 8,5.

1.6.2. **Prístroje**

Všetky prístroje musia byť vyrobené z chemicky inertného materiálu.

— automatický zrieďovací systém (pre prietokový test),

— prístroj na meranie koncentrácie kyslíka,

— zariadenie na stanovenie tvrdosti vody,

— adekvátny prístroj na kontrolu teploty,

— pH meter.

1.6.3. **Testované ryby**

Ryby by mali byť zdravé a bez akýchkoľvek zjavných znetvorení.

▼B

Druh rýb sa vyberie len na základe praktických kritérií, ako je ich dobrá dostupnosť počas celého roka, vhodné udržiavanie, vhodnosť na testovanie, relatívna citlivosť na látky alebo prípravky, ako aj každý ekonomický, biologický alebo ekologický faktor, ktorý má nejaký význam. Potrebu porovnateľnosti získaných údajov a existujúcu medzinárodnú harmonizáciu (odkaz 1) je tiež nutné brať do úvahy pri výbere druhu rýb.

Zoznam druhov rýb, ktoré sa odporúčajú pre tento test, je uvedený v dodatku 2; odporúčanými druhmi sú dánio pruhované a pstruh dúhový.

1.6.3.1. *Chov*

Testované ryby majú byť z jednej zásoby podobnej dĺžky a veku. Musia sa udržiavať najmenej 12 dní za týchto podmienok:

dávkovanie:

vhodné pre systém (recirkulácia alebo prietok) a druh rýb,

voda:

pozri 1.6.1.2,

svetlo:

12 až 16 hodín osvetlenia denne,

koncentrácia rozpusteného kyslíka:

najmenej 80 % hodnoty nasýtenia vzdušným kyslíkom,

kŕmenie:

trikrát za týždeň alebo denne, s prerušením 24 hodín pred začiatkom testu.

1.6.3.2. *Úmrtnosť (mortalita)*

Po 48-hodinovej počiatočnej perióde sa zaznamenáva úmrtnosť, pričom sa aplikujú tieto kritériá:

— viac ako 10 % populácie v priebehu siedmich dní:

zrušenie celej násady,

— medzi 5 % až 10 % populácie:

udržiavacia perióda sa predĺži o ďalších sedem dní.

Ak nedôjde k ďalším úmrtiam, násada je prijateľná, inak sa zruší,

— menej ako 5 % populácie:

násada je prijateľná.

1.6.4. **Adaptácia**

Predtým, ako sa ryby použijú v teste, musia sa adaptovať aspoň sedem dní na vodu tej istej kvality a teploty, aká sa použije pri teste.

▼B

1.6.5. **Testovací postup**

Definitívnemu testovaniu môže predchádzať vyhľadávací test, aby sa získala informácia o rozsahu koncentrácií, ktoré sa použijú v hlavnom teste.

Vykonáva sa jedna kontrola bez testovanej látky, a ak je to možné, tiež sa vykonáva jedna kontrola obsahujúca pomocnú látku, navyše k testovaným sériám.

V závislosti od fyzikálnych a chemických vlastností testovanej látky alebo prípravku sa vyberie statický, semistatický alebo prietokový test ako vhodný, tak aby spĺňal kritériá kvality.

Ryby sú exponované látke tak, ako je uvedené nižšie:

— trvanie: 96 hodín,

— počet zvierat: aspoň 7 na každú koncentráciu,

— nádrže: vhodnej kapacity vo vzťahu k odporučenej náplni,

— dávkovanie: maximálne dávkovanie 1 g/liter sa odporúča pre statický a semistatický test, pri prietokovom systéme je prijateľné aj vyššie dávkovanie,

— testovaná koncentrácia: aspoň päť koncentrácií líšiacich sa konštantným faktorom nepresahujúcim 2,2 a tak, ako je to možné, zaberajúcich rozsah od 0 % do 100 % úmrtnosti,

— voda: pozri 1.6.1.2,

— svetlo: 12 až 16 hodín osvetlenia denne,

— teplota: vhodná pre príslušný druh (pozri dodatok 2), ale len v rozsahu ± 1 ^{o}C pre každý jednotlivý test,

— koncentrácia rozpusteného kyslíka: nie menej ako 60 % hodnoty nasýtenia vzdušným kyslíkom pri danej teplote,

— kŕmenie: žiadne.

Ryby sa skontrolujú po prvých 2 až 4 hodinách a v 24-hodinových intervaloch. Ryby sa považujú za mŕtve, ak nevykazujú žiadnu reakciu po dotyku na chvostovú stopku a nie sú viditeľné žiadne dýchacie pohyby. Mŕtve ryby sa odstránia a zaznamená sa úmrtnosť. Zaznamenávajú sa aj viditeľné abnormality (napr. strata rovnováhy, zmeny v plávaní, zmeny v dýchaní, pigmentácia atď.).

Denne sa musí vykonať meranie pH, rozpusteného kyslíka a teploty.

Limitný test

Pri použití postupov opísaných v tejto metóde limitný test sa môže vykonať pri koncentrácii 100 mg/l, aby sa demonštrovalo, že LC_{50} je väčšia ako táto koncentrácia.

Ak sú vlastnosti látky také, že sa nemôže dosiahnuť koncentrácia 100 mg/liter v testovanom roztoku, limitný test sa vykoná pri koncentrácii rovnej rozpustnosti látky (alebo pri maximálnej koncentrácii, pri ktorej dochádza k tvorbe stabilnej disperzie) v použitom médiu (pozri tiež bod 1.6.1.1).

▼B

Limitný test by sa mal vykonať použitím 7 až 10 rýb s rovnakým počtom rýb v kontrole. (Z binomickej teórie vyplýva, že pri použití 10 rýb s nulovou úmrtnosťou je 99,9 % spoľahlivosť, že LC_{50} je väčšia ako koncentrácia použitá v limitnom teste. Pri 7, 8 alebo 9 rybách za nulovej úmrtnosti je prinajmenšom 99 % spoľahlivosť, že LC_{50} je väčšia ako použitá koncentrácia.)

Pri výskyte úmrtnosti sa musí vykonať kompletná štúdia. Ak sa pozorujú subletálne účinky, tieto by sa mali zaznamenať.

2. **ÚDAJE A VYHODNOTENIE**

Pre každú periódu expozície, keď boli zapísané pozorovania (24, 48, 72 a 96 hodín), sa zaznamenáva percentuálna úmrtnosť oproti príslušnej koncentrácii na semilogaritmickom papieri.

Keď je to možné, pre každý pozorovací čas by sa mali odhadnúť LC_{50} a limity spoľahlivosti ($p = 0,05$) použitím štandardných postupov, tieto hodnoty sa zaokrúhlia na jedno alebo väčšinou dve platné číslice (príklady zaokrúhlenia na dve číslice: 173,5 na 170, 0,127 na 0,13 a 1,21 na 1,2).

V tých prípadoch, keď sklon krivky koncentrácia/percentá je príliš strmý a neumožňuje výpočet LC_{50}, stačí grafický odhad tejto hodnoty.

Keď v dvoch po sebe nasledujúcich koncentráciách v pomere 2,2 dochádza len k 0 % a 100 % úmrtnosti, tieto dve hodnoty stačia na indikovanie rozsahu, do ktorého patrí LC_{50}.

Ak sa pozoruje, že nemožno udržať stabilitu ani homogenitu testovanej látky, toto by sa malo zaznamenať a výsledky by sa mali interpretovať so zvýšenou pozornosťou.

3. **SPRÁVA**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

— informácie o testovaných rybách (vedecký názov, kmeň, dodávateľ, predbežné ošetrenie, veľkosť a počet rýb použitých pri každej testovanej koncentrácii),

— zdroj vody a jej hlavné chemické charakteristiky (pH, tvrdosť, teplota),

— v prípade látky s nízkou rozpustnosťou metódy prípravy zásobného a skúšobného roztoku,

— koncentráciu všetkých pomocných látok,

— zoznam použitých koncentrácii a všetky dostupné informácie týkajúce sa stability testovanej látky alebo prípravku pri daných koncentráciách v testovanom roztoku,

— použité metódy a získané výsledky, ak sa vykonala analýza látky alebo prípravku,

— výsledky limitného testu, ak sa vykonal,

— dôvody na výber testu a detaily použitého skúšobného postupu (napr. statický, semi-statický, dávkovanie, informácia o prevzdušňovaní, dávkovanie rýb a pod.),

▼B

— opis skúšobného zariadenia,

— režim osvetlenia,

— koncentráciu rozpusteného kyslíka, pH hodnoty a teploty skúšobných roztokov každých 24 hodín,

— dôkaz, že boli splnené kritériá kvality,

— tabuľku uvádzajúcu kumulatívnu úmrtnosť pri každej koncentrácii a kontrolu (a tiež kontrolu s pomocnou látkou, ak je to potrebné) pri všetkých odporučených pozorovacích časoch,

— graf závislosti koncentrácia/percentá na konci testu,

— ak je to možné, hodnoty LC_{50} pri každom z odporučených pozorovacích časov (s 95 % limitom spoľahlivosti),

— štatistické postupy použité pri stanovení hodnôt LC_{50},

— výsledky získané s referenčnou látkou, ak sa použila;

— najvyššiu testovanú koncentráciu nespôsobujúcu úmrtnosť počas celého testu,

— najnižšiu testovanú koncentráciu spôsobujúcu 100 % úmrtnosť počas celého testu.

4. **ODKAZY**

(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 (L 1) und L(15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 – Water – Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Commitee 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-AWWAWPCF, 1975.

(13) Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen fur die okotoxikologische Bewerrung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm. Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

(16) Finney, D. J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

(17) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793–821.

(18) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3 – 32.

(19) Stephan, C. E. Method for calculating an LC_{50} 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

Dodatok 1

Rekonštituovaná voda

Príklad vhodnej rozpúšťacej vody

Všetky chemické látky musia byť analytickej čistoty.

Voda má byť destilovaná, dobrej kvality alebo deionizovaná s vodivosťou menej ako 5 μScm^{-1}.

Prístroj na destiláciu vody nesmie obsahovať žiadne časti vyrobené z medi.

Zásobné roztoky

$CaCl_2.2H2O$ (dihydrát chloridu vápenatého): 11,76 g
Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.

$MgS0_4.7H2O$ (heptahydrát síranu horečnatého): 4,93 g
Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.

$NaHCO_3$ (hydrouhličitan sodný): 2,59 g
Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.

KCl (chlorid draselný): 0,23 g
Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.

Rekonštituovaná rozpúšťacia voda

Zmiešajte 25 ml z každého zo štyroch zásobných roztokov a doplňte do 1 litra vodou.

Prevzdušňujte, pokiaľ sa koncentrácia rozpusteného kyslíka nebude rovnať koncentrácii nasýtenia vzdušným kyslíkom.

Hodnota pH by mala byť 7,8 ± 0,2.

Ak je to potrebné, upravte pH s NaOH (hydroxidom sodným) alebo s HCl (kyselinou chlorovodíkovou).

Takto pripravená rozpúšťacia voda sa nechá stáť asi 12 hodín a nesmie sa ďalej prevzdušňovať.

Celkové množstvo Ca a Mg iónov v tomto roztoku je 2,5 mmol na liter. Pomer Ca: Mg iónov je 4: 1 a pomer Na: K iónov je 10: 1. Celková alkalita roztoku je 0,8 mmol na liter.

Žiadna odchýlka pri príprave rozpúšťacej vody nesmie zmeniť zloženie ani vlastnosti vody.

▼B

Dodatok 2

Druhy rýb odporučených na testovanie

Odporučený druh	Odporučený rozsah teplôt pri teste(° C)	Odporučená celková dĺžka rýb (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton – Buchanan), danio pruhované	20 až 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque), Fathead minnow	20 až 24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758), kapor obyčajný	20 až 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck a Schlegel 1850), halančík japonský	20 až 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859), pávie očko	20 až 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque, Linneanus 1758), slnečnica modrá	20 až 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988), pstruh dúhový	12 až 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneanus 1758), jalec zlatý	20 až 24	6,0 ± 2,0

Získavanie rýb

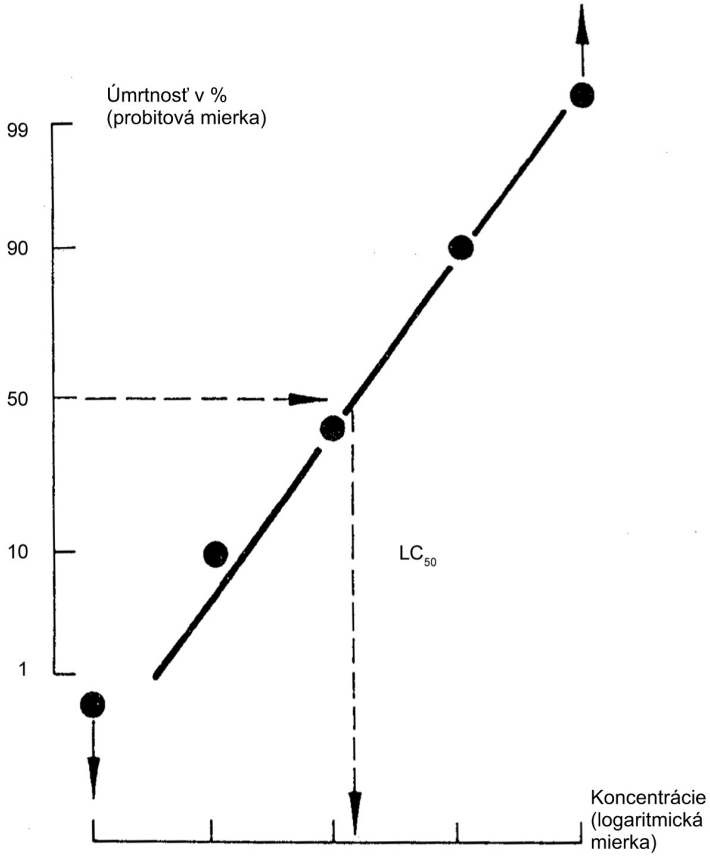
Ryby uvedené v zozname vyššie sa dajú veľmi dobre chovať a sú dostupné počas celého roka. Dajú sa dobre rozmnožovať a chovať na rybárskych farmách alebo v laboratóriu, za kontrolovaných podmienok, čo sa týka ochorení a parazitov, takže testované zvieratá sú zdravé a známeho rodičovského pôvodu. Tieto ryby sú dostupné v mnohých častiach sveta.

▼B

Dodatok 3

Príklad krivky závislosti mortality, vyjadrenej v percentách, od koncentrácie

Príklad stanovenia LC_{50} na pravdepodobnostnom logaritmickom papieri



▼B

C.2. **TEST AKÚTNEJ IMOBILIZÁCIE DAFNIÍ *(DAPHNIA* SP.)**

1. **METÓDA**

Táto metóda testu akútnej imobilizácie je ekvivalentná OECD TG 202 (2004).

1.1. ÚVOD

Táto metóda opisuje test akútnej toxicity na posúdenie účinkov chemikálií na dafnie. Existujúce testovacie metódy sa použili v najväčšom možnom rozsahu – pozri (1, 2, 3).

1.2. VYMEDZENIE POJMOV

V kontexte tejto metódy sa používajú tieto definície:

EC_{50}: je koncentrácia odhadnutá na imobilizovanie 50 % dafnií počas stanovenej expozičnej doby; ak sa použije iná definícia, musí sa to zaznamenať spolu s príslušným odkazom.

Imobilizácia: Tie živočíchy, ktoré nedokážu plávať do 15 sekúnd po jemnom premiešaní testovacej nádoby, sa pokladajú za imobilizované (a to aj keď ešte stále dokážu pohybovať svojimi tykadlami).

1.3. PODSTATA TESTOVACEJ METÓDY

Mladé dafnie, ktoré sú na začiatku testu mladšie ako 24 hodín, sú počas 48 hodín exponované testovanej chemickej látke v rôznych koncentráciách. Imobilizácia sa zaznamenáva po 24 hodinách a 48 hodinách sa porovnáva s kontrolnými hodnotami. Výsledky sa analyzujú, aby sa vypočítali hodnoty EC_{50} po 48 h (pozri definície uvedené v oddiele 1.2). Stanovenie hodnoty EC_{50} po 24 hodinách je voliteľné.

1.4. ÚDAJE O TESTOVANEJ CHEMICKEJ LÁTKE

Pre testovanú látku by mala byť známa rozpustnosť vo vode a tlak pary a ďalej by mala byť dostupná spoľahlivá analytická metóda na stanovenie koncentrácie danej látky v testovacom roztoku udanou účinnosťou výťažnosti a mala by byť dostupná medza stanovenia. Medzi užitočné informácie patrí štruktúrny vzorec, čistota látky, stabilita vo vode alebo na svetle, P_{ow} a výsledky testu biodegradácie (pozri metódu C.4).

Poznámka: Usmernenie na testovanie látok, ktorých testovanie je v dôsledku ich fyzikálno-chemických vlastností ťažko uskutočniteľné, sú uvedené v odkazoch na literatúru (4).

1.5. REFERENČNÉ CHEMICKÉ LÁTKY

Ako prostriedok na zaistenie spoľahlivých testovacích podmienok možno referenčnú látku testovať so zreteľom na hodnotu EC_{50}. Na tento účel sa odporúča použiť toxické látky používané pri medzinárodných kruhových testoch – pozri odkazy na literatúru (1, 5) ([1]). Test (testy) s referenčnou chemickou látkou by sa mali vykonávať prednostne každý mesiac a najmenej dvakrát ročne.

([1]) Vo výsledkoch týchto medzilaboratórnych testov a technických korigendách k norme ISO 6341 sa udáva hodnota EC_{50} po 24 hodinách pre dvojchróman draselný ($K_2Cr_2O_7$) v rozsahu od 0,6 mg/l do 1,7 mg/l.

▼B

1.6. KVALITATÍVNE KRITÉRIÁ

Platnosť testu je podmienená splnením týchto kritérií:

— v kontrolných vzorkách, vrátane kontrolnej vzorky obsahujúcej solubilizačné činidlo, by nemalo byť imobilizovaných viac ako 10 % dafnií,

— koncentrácia rozpusteného kyslíka na konci testu by mala zodpovedať hodnote > 3 mg/l v kontrolných a testovacích nádobách.

Poznámka: Pri prvom kritériu by viac ako 10 % kontrolných dafnií nemalo vykazovať imobilizáciu ani iné príznaky ochorenia alebo stresu, napríklad zmenu sfarbenia, nezvyčajné správanie, ako je napríklad uviaznutie na hladine vody.

1.7. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.7.1. **Aparatúra**

Testovacie nádoby a iná aparatúra, ktoré prídu do styku s testovacími roztokmi, by mali byť vyrobené výlučne zo skla alebo iného chemicky inertného materiálu. Testovacími nádobami sú bežne sklené skúmavky alebo kadičky; pred každým použitím by sa mali vyčistiť štandardnými laboratórnymi postupmi. Testovacie nádoby by sa mali voľne prekryť, aby sa znížili straty vody v dôsledku odparovania a aby sa predišlo vnikaniu prachu do roztokov. Prchavé látky by sa mali testovať v úplne zaplnených a uzavretých nádobách dostatočne veľkých, aby sa zabránilo limitným alebo príliš nízkym koncentráciám kyslíka (pozri oddiel 1.6 a prvý odsek oddielu 1.8.3).

Okrem toho sa budú používať niektoré alebo všetky tieto zariadenia: oxymeter (s mikroelektródou alebo iným vhodným snímačom na meranie rozpusteného kyslíka vo vzorkách s malým objemom); pH-meter; zodpovedajúca aparatúra na kontrolu teploty; vybavenie na stanovenie celkovej koncentrácie organického uhlíka (TOC); vybavenie na stanovenie chemickej spotreby kyslíka (COD); vybavenie na stanovenie tvrdosti atď.

1.7.2. **Testovacie organizmy**

Preferovaným testovacím druhom *Daphnia magna* Straus, aj keď pri tomto teste možno takisto použiť ďalšie vhodné druhy dafnií (napríklad *Daphnia pulex)*. Na začiatku testu by živočíchy mali byť mladšie ako 24 hodín a na zníženie variability sa dôrazne odporúča, aby neboli z prvej generácie potomkov. Mali by pochádzať zo zdravého rodu (t. j. bez príznakov stresu, ako napríklad vysoká mortalita, prítomnosť samcov a efipií, oneskorené liahnutie prvých potomkov, zmena sfarbenia organizmov atď.). Všetky organizmy použité v konkrétnom teste by mali pochádzať z kultúr vypestovaných z rovnakého rodu dafnií. Tento rod živočíchov sa musí uchovávať v kultivačných podmienkach (svetlo, teplota, médium), ktoré sa podobajú podmienkam v použitom teste. Ak sa má v teste použiť kultivačné médium odlišné od rutinného kultivačného média dafnií, je správnou praxou zaradiť predtestové aklimatizačné obdobie. Na tento účel by sa generácia dafnií mala uchovávať v riediacej vode pri testovacej teplote aspoň počas 48 hodín pred začiatkom testu.

▼B

1.7.3. **Zadržiavacia a riediaca voda**

Prírodná voda (povrchová alebo podzemná voda), rekonštituovaná voda alebo odchlórovaná voda z vodovodu sú prijateľné ako zadržiavacia a riediaca voda, ak v nej dafnie prežijú počas celej kultivácie, aklimatizácie a testovania bez príznakov stresu. Každá voda, ktorá vyhovuje chemickým charakteristikám prijateľnej riediacej vody podľa zoznamu uvedeného v dodatku 1, je vhodná ako testovacia voda. Počas trvania testu by si voda mala mať stálu kvalitu. Rekonštituovanú vodu možno vyrobiť pridaním špecifického množstva reagentov uznanej analytickej čistoty do deionizovanej alebo destilovanej vody. Príklady rekonštituovanej vody sú uvedené v odkazoch na literatúru (1), (6) a v dodatku 2. Je dôležité poznamenať, že médiá obsahujúce známe chelačné činidlá, ako sú médiá M4 a M7 v dodatku 2, by sa nemali používať na testovanie látok obsahujúcich kovy. Hodnota pH by mala byť v rozsahu od 6 do 9. Pre *Daphnia magna* sa odporúča tvrdosť vody v rozsahu od 140 do 250 mg/l (ako $CaCO_3$), pričom pre ostatné druhy dafnií môže byť vhodná aj nižšia tvrdosť vody. Riediaca voda sa pred použitím v teste môže prevzdušňovať, aby sa dosiahla nasýtená koncentrácia rozpusteného kyslíka.

Ak sa používa prírodná voda, parametre kvality by sa mali merať aspoň dvakrát ročne, alebo vždy, keď vznikne podozrenie, že sa tieto parametre mohli výrazne zmeniť (pozri predchádzajúci odsek a prílohu 1). Mal by sa stanoviť aj obsah ťažkých kovov (napríklad Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Ak sa používa odchlórovaná voda z vodovodu, odporúča sa každodenná analýza obsahu chlóru. Ak riediaca voda pochádza z povrchového alebo podzemného zdroja vody, mali by sa stanoviť jej vodivosť a celkový organický uhlík (TOC) alebo chemického kyslíka (COD).

1.7.4. **Testovacie roztoky**

Testovacie roztoky so zvolenými koncentráciami sa zvyčajne pripravujú riedením základného roztoku. Zásobné roztoky by sa prednostne mali pripravovať rozpustením testovanej látky v riediacej vode. V najvyššej možnej miere by sa malo zabrániť použitiu rozpúšťadiel, emulgátorov alebo dispergačných činidiel. Tieto činidlá však môžu byť v niektorých prípadoch potrebné na vytvorenie vhodne koncentrovaného zásobného roztoku. Usmernenie k výberu vhodných rozpúšťadiel, emulgačných a dispergačných činidiel je uvedené v odkaze na literatúru (4). Testovaná látka by rozhodne nemala v testovacích roztokoch presiahnuť hranicu rozpustnosti v riediacej vode.

Test by sa mal vykonať bez úpravy pH. Ak pH nezostane v rozmedzí 6 – 9, potom by sa mohol vykonať druhý test, pri ktorom sa upraví pH základného roztoku na hodnotu, ktorú vykazuje riediaca voda pred pridaním testovanej látky. Úprava hodnoty pH by sa mala vykonať tak, aby sa významne nezmenila koncentrácia zásobného roztoku a aby nedošlo k chemickej reakcii alebo zrážaniu testovanej látky. Prednosť sa dáva použitiu HCl a NaOH.

▼B

1.8. POSTUP

1.8.2. **Podmienky expozície**

1.8.1.1. *Testované skupiny a kontrolné vzorky*

Testovacie nádoby sa naplnia príslušným objemom riediacej vody a roztoku testovanej látky. Pomer objemov vzduchu a vody v nádobe by mal byť rovnaký pre testovanú i kontrolnú skupinu. Potom sa do testovacích nádob vložia dafnie. Pre každú testovaciu koncentráciu a pre každú kontrolnú vzorku by sa malo použiť najmenej 20 organizmov, rozdelených prednostne do štyroch skupín po piatich organizmoch. Na každý organizmus by sa malo použiť aspoň 2 ml testovacieho roztoku (to znamená 10 ml pre 5 dafnií v každej testovacej nádobe). Ak nebude koncentrácia testovanej látky stála, test sa môže vykonať s použitím polostatickej obnovy alebo prietokového systému.

Okrem testovacej série sa musí vykonať jedna séria kontrol s riediacou vodou, a ak je to relevantné, tak aj kontrolná séria obsahujúca solubilizačné činidlo.

1.8.1.2. *Testovacie koncentrácie*

Ak nie sú dostupné informácie o toxicite testovanej látky, možno rozsah koncentrácií konečného testu stanoviť testom na stanovenie rozsahu. Na tento účel sa dafnie exponujú sérii široko odstupňovaných koncentrácií testovanej látky. Každej testovacej koncentrácii by sa malo exponovať päť dafnií počas 48 hodín alebo počas kratšieho času a opakovanie testu nie potrebné. Expozičnú dobu možno skrátiť (napríklad na 24 hodín alebo menej), ak za kratší čas možné získať údaje pre test na zistenie rozsahu.

Malo by sa použiť najmenej päť testovacích koncentrácií. Tieto koncentrácie by mali tvoriť geometrický rad s rozdeľovacím koeficientom, ktorý by nemal presiahnuť 2,2. Použitie menej ako 5 koncentrácií by sa malo zdôvodniť. Podľa možnosti by najvyššia testovaná koncentrácia mala vyvolať 100 % imobilizáciu a najnižšia testovaná koncentrácii by nemala mať pozorovateľné účinky.

1.8.2.3. *Inkubačné podmienky*

Teplota by sa mala byť v rozsahu od 18 °C do 22 °C a pri každom jednotlivom teste by teplota ma byť stála v rozpätí ± 1 °C. Odporúča sa cyklus so 16 hodinami svetla a 8 hodinami tmy. Úplná tma je takisto prijateľná, najmä pre testované látky nestabilné na svetle.

Testovacie nádoby sa počas testu nesmú prevzdušňovať. Test sa vykonáva bez úpravy hodnoty pH. Dafnie by sa počas testu nemali kŕmiť.

1.8.1.4. *Dĺžka trvania testu*

Dĺžka trvania testu je 48 hodín.

1.8.2. **Pozorovania**

V každej testovacej nádobe by sa mal skontrolovať počet imobilizovaných dafnií po 24 a 48 hodinách od začiatku testu (pozri definície v oddiele 1.2). Okrem imobility by sa malo zaznamenať aj nezvyčajné správanie alebo vzhľad.

▼B

1.8.3. **Analytické merania**

Koncentrácie rozpusteného kyslíka a pH sa merajú na začiatku a na konci testu v kontrolných vzorkách a pri najvyššej koncentrácii testovanej látky. Koncentrácia rozpusteného kyslíka v kontrolných testoch by mala zodpovedať kritériu validity (pozri oddiel 1.6). Za bežných okolností by sa hodnota pH pri žiadnom teste nemala zmeniť o viac ako o 1,5 jednotky. Teplota sa zvyčajne meria v kontrolných nádobách alebo v okolitom vzduchu a mala by sa zaznamenávať prednostne nepretržite počas testu alebo aspoň na jeho začiatku a na konci.

Koncentrácia testovanej látky by sa mala zmerať aspoň pri najvyššej a najnižšej testovacej koncentrácii a na začiatku a na konci testu (4). Odporúča sa, aby výsledky boli založené na zmeraných koncentráciách. Ak je však k dispozícii dôkaz preukazujúci, že počas celého testu bola koncentrácia testovanej látky uspokojivo udržiavaná v rozmedzí ± 20 % menovitej alebo počiatočnej nameranej koncentrácie, je možné výsledky založiť na menovitých alebo nameraných počiatočných hodnotách.

1.9. LIMITNÝ TEST

Pomocou postupov opísaných v tejto metóde možno vykonať limitný test so 100 mg/l testovanej látky alebo do výšky jej rozpustnosti v testovacom médiu (podľa toho, ktorá hodnota je nižšia) s cieľom preukázať, že hodnota EC_{50} je vyššia ako táto koncentrácia. Limitný test treba vykonať s použitím 20 dafnií (podľa možnosti rozdelených do štyroch skupín po piatich dafniách), pričom rovnaký počet organizmov je aj v kontrolných testoch. Ak dôjde k imobilizácii, mala by sa vykonať úplná štúdia. Akékoľvek nenormálne správanie organizmov by sa malo zaznamenať.

2. **ÚDAJE**

Údaje by sa mali zhrnúť v tabuľkovej podobe, pričom pri každej exponovanej skupine a kontrolnom teste je potrebné uviesť počet použitých dafnií a imobilizáciu pri každom pozorovaní. Percentuálny podiel imobilizovaných organizmov za 24 hodín a 48 hodín sa vynesie vzhľadom na testované koncentrácie. Údaje sa analyzujú pomocou vhodných štatistických metód (napríklad probitová analýza atď.) s cieľom vypočítať sklon kriviek a hodnôt EC_{50} s 95 % intervalmi spoľahlivosti ($p = 0,05$) (7), (8).

Ak nemožno zo získaných údajov vypočítať EC_{50} štandardnými metódami, mala by byť hodnota EC_{50} aproximovaná ako geometrická stredná hodnota z najvyššej koncentrácie nespôsobujúca imobilizáciu a najnižšej koncentrácie spôsobujúcej 100 % imobilitu.

3. **VYKAZOVANIE**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o vykonaní testu musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálna podstata a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti,

▼B

— identifikačné chemické údaje vrátane čistoty.

Testovací živočíšny druh:

— zdroj a živočíšny druh *Daphnia,* dodávateľ zdroja (ak je známy) a použité kultivačné podmienky (vrátane zdroja, druhu a množstva potravy, frekvencie kŕmenia).

Testovacie podmienky:

— opis testovacích nádob: typ nádob, objem roztoku, počet dafnií v každej testovacej nádobe, počet testovacích nádob (replikáty) na jednu koncentráciu,

— metódy prípravy zásobných a testovacích roztokov vrátane použitia akýchkoľvek rozpúšťadiel alebo dispergačných činidiel, použité koncentrácie,

— podrobnosti o riediacej vode: zdroj a kvalitatívne charakteristiky vody (pH, tvrdosť, pomer Ca/Mg, pomer Na/K, zásaditosť, vodivosť atď.); zloženie rekonštituovanej vody, ak sa použila,

— inkubačné podmienky: teplota, intenzita svetla a jeho periodicita, rozpustený kyslík, pH atď.

Výsledky:

— počet a percentuálny podiel dafnií, ktoré boli imobilizované alebo u ktorých sa prejavili nejaké nežiaduce účinky (vrátane nenormálneho správania) v kontrolných vzorkách a v každej exponovanej skupine v jednotlivých časoch pozorovania, a opis povahy pozorovaných účinkov,

— výsledky a dátum vykonania testu s referenčnou látkou, ak sú dostupné,

— menovité testovacie koncentrácie a výsledky všetkých analýz na stanovenie koncentrácie testovanej látky v testovacích nádobách; takisto by sa mala uviesť výťažnosť metódy a medzu stanovenia,

— všetky fyzikálno-chemické merania teploty, pH a rozpusteného kyslíka vykonávané počas testu,

— hodnota EC_{50} po 48 hodinách pre imobilizáciu spolu s uvedením intervalov spoľahlivosti a grafmi upraveného modelu použitého na výpočet tejto hodnoty, sklony kriviek závislosti odozvy od dávky a ich smerodajná chyba; štatistické postupy použité na stanovenie hodnoty EC_{50}; (ak sa tieto parametre merali aj pre imobilizáciu po 24 hod., mali by sa taktiež uviesť),

— vysvetlenie akejkoľvek odchýlky od testovacej metódy a toho, či táto odchýlka ovplyvnila výsledky testu.

4. **ODKAZY NA LITERATÚRU**

(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 JL. Hamelink). ASTM STP 634 – American Society for Testing and Materials. Pp 65 – 84

(8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

DODATOK 1

NIEKTORÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY PRIJATEĽNEJ RIEDIACEJ VODY

Látka	Koncentrácia
Tuhé častice	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Neionizovaný čpavok	< 1 µg/l
Reziduálny chlór	< 10 µg/l
Celkové organofosfátove pesticídy	< 50 ng/l
Celkové organofosfátove pesticídy a polychlórované bifenyly	< 50 ng/1
Celkový organický chlór	< 25 ng/1

▼B

DODATOK 2

PRÍKLADY VHODNEJ REKONŠTITUOVANEJ TESTOVACEJ VODY

Testovacia voda ISO (1)

Zásobné roztoky (jedna látka)		Na prípravu rekonštituovanej vody pridajte toto množstvo základného roztoku do 1 litra vody (*)
Látka	Množstvo pridané do 1 litra vody (*)	
Chlorid vápenatý $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Síran horečnatý $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Uhličitan sodný $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Chlorid draselný KC1	0,23 g	25 ml

(*) Voda s primeranou čistotou, napr. deionizovaná, destilovaná, prípadne voda získaná reverznou osmózou s vodivosťou, ktorá by nemala presahovať 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Elendtovo médium M7 a M4

Aklimatizácia na Elendtovo médium M4 a M7

V niektorých laboratóriách mali ťažkosti pri priamom prenose dafnií do médií M4 a M7. Na druhej strane sa však dosiahol určitý úspech s postupnou aklimatizáciou, t. j. prenosom z vlastného média do 30 % Elendtovho média, potom do 60 % Elendtovho média a následne do 100 % Elendtovho média. Potrebná dĺžka aklimatizačného obdobia môže byť až jeden mesiac.

Príprava

Stopové prvky

Vo vode vykazujúcej vhodnú čistotu, napríklad v deionizovanej, destilovanej, prípadne vo vode získanej reverznou osmózou, sa najprv pripravia samostatné zásobné roztoky (I) jednotlivých stopových prvkov. Z týchto oddelených zásobných roztokov (I) sa pripraví jeden zásobný roztok (II), ktorý obsahuje všetky stopové prvky (kombinovaný roztok), t. j.:

Zásobný(-é) roztok(-y) I (jedna látka)	Množstvo pridané do vody (mg/l)	Koncentrácia (vzhľadom na médium M4)	Na prípravu kombinovaného zásobného roztoku II pridajte do vody toto množstvo základného roztoku I (ml/l)	
			M4	M7
H_3 BO_3	57 190	20 000-násobná	1,0	0,25
$MnCl_2$ $4H_2O$	7 210	20 000-násobná	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-násobná	1,0	0,25

▼B

Zásobný(-é) roztok(-y) I (jedna látka)	Množstvo pridané do vody (mg/l)	Koncentrácia (vzhľadom na médium M4)	Na prípravu kombinovaného zásobného roztoku II pridajte do vody toto množstvo základného roztoku I (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000-násobná	1,0	0,25
$SrCl_2$ $6H_2O$	3 040	20 000-násobná	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-násobná	1,0	0,25
Na_2 MoO_4 $2H_2O$	1 230	20 000-násobná	1,0	0,25
$CuCl_2$ $2H_2O$	335	20 000-násobná	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-násobná	1,0	1,0
$CoCl_2$ $6H_2O$	200	20 000-násobná	1,0	1,0
KI	65	20 000-násobná	1,0	1,0
Na_2 SeO_3	43,8	20 000-násobná	1,0	1,0
NH_4 VO_3	11,5	20 000-násobná	1,0	1,0
Na_2 EDTA $2H_2O$	5 000	20 000-násobná	—	—
$FeSO_4$ $7H_2O$	1 991	20 000-násobná	—	—

Ako roztok Na 2 EDTA, tak roztok $FeSO_4$ sa pripraví samostatne, zlejú sa spolu a ihneď sa ošetria v autokláve.

Týmto sa získa:

2 l Fe-EDTA roztoku		1 000-násobná	20,0	5,0

Médiá M4 aM7

Médiá M4 a M7 sa pripravia pomocou zásobného roztoku II, makroživín a vitamínov takto:

	Množstvo pridané do vody (mg/l)	Koncentrácia (vzhľadom na médium M4)	Množstvo zásobného roztoku II pridané na prípravu média II (ml/l)	
			M4	M7
Zásobný roztok II (kombinované stopové prvky)		20-násobná	50	50
Zásobné roztoky s obsahom makroživiny (jedna látka)				
$CaCl_2 \cdot 2H_20$	293 800	1 000-násobná	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000-násobná	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-násobná	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-násobná	1,0	1,0
Na_2 $SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000-násobná	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-násobná	0,1	0,1
KH_2 PO_4	1 430	10 000-násobná	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-násobná	0,1	0,1

▼B

	Množstvo pridané do vody (mg/l)	Koncentrácia (vzhľadom na médium M4)	Množstvo zásobného roztoku II pridané na prípravu média II (ml/l)	
			M4	M7
Zásobný roztok s obsahom viacerých vitamínov	—	10 000-násobná	0,1	0,1
Zásobný roztok s obsahom viacerých vitamínov sa pripraví pridaním 3 vitamínov do 1 litra vody týmto spôsobom:				
Thiamín hydrochlorid	750	10 000-násobná		
Kyanokobalamín (B_{12})	10	10 000-násobná		
Biotín	7,5	10 000		

Kombinovaný vitamínový zásobný roztok sa skladuje zmrazený v malých alikvótnych častiach. Vitamíny sa pridávajú do média tesne pred použitím.

Poznámka: Precipitácii solí počas prípravy kompletného média sa zabráni pridaním alikvotných množstiev zásobných roztokov do približne 500 – 800 ml deionizovanej vody a potom sa objem doplní na 1 liter.

Poznámka: Prvýkrát boli informácie o médiu M4 uverejnené v práci Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25 – 33.

▼M6

C.3. SLADKOVODNÉ RIASY A SINICE, TEST INHIBÍCIE RASTU

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 201 (2006, príloha upravená v roku 2011). Zistila sa potreba rozšíriť testovaciu metódu tak, aby zahŕňala ďalšie druhy, a aktualizovať ju s cieľom splniť požiadavky týkajúce sa hodnotenia nebezpečnosti a klasifikácie chemikálií. Táto revízia sa uskutočnila na základe rozsiahlych praktických skúseností, vedeckého pokroku v oblasti štúdií toxicity rias a rozsiahleho regulačného využitia, ku ktorému došlo od pôvodného prijatia metódy.

2. Vymedzenie použitých pojmov je uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

3. Účelom tohto testu je stanoviť účinky chemikálie na rast sladkovodných mikrorias a/alebo siníc. Exponenciálne rastúce testované organizmy sú vystavené testovanej chemikálii v jednorazových kultúrach zvyčajne počas 72 hodín. Napriek pomerne krátkej dĺžke testu sa môžu hodnotiť účinky na niekoľkých generáciách.

4. Reakciou systému je zníženie rastu v sérii kultúr rias (testovacie jednotky) vystavených rôznym koncentráciám testovanej chemikálie. Reakcia sa hodnotí ako funkcia expozičnej koncentrácie v porovnaní s priemerným rastom replikovaných, nevystavených kontrolných kultúr. Na preukázanie úplnej reakcie systému na toxické účinky (optimálna citlivosť) sa kultúram umožní neobmedzený exponenciálny rast v podmienkach s vhodnými živinami a nepretržitým svetlom v čase postačujúcom na meranie zníženia špecifickej rýchlosti rastu.

5. Rast a inhibícia rastu sa kvantifikujú meraním množstva biomasy rias ako funkcie času. Biomasa rias je vymedzená ako sušina na objem, napríklad mg rias/liter testovacieho roztoku. Suchá hmotnosť sa však zložito meria, a preto sa používajú náhradné parametre. Z týchto náhradných parametrov sa najčastejšie používa počet buniek. Iné náhradné parametre zahŕňajú objem buniek, fluorescenciu, optickú hustotu atď. Je potrebné poznať prepočítavací koeficient medzi meraným náhradným parametrom a množstvom biomasy.

6. Konečným bodom testu je inhibícia rastu vyjadrená ako logaritmický nárast množstva biomasy (priemerná špecifická rýchlosť rastu) počas expozície. Z priemerných hodnôt špecifickej rýchlosti rastu zaznamenaných v sérii testovacích roztokov sa stanoví koncentrácia, ktorá spôsobuje špecifickú x % inhibíciu rýchlosti rastu (napr. 50 %), a vyjadrí sa ako E_rC_x (napr. E_rC_{50}).

7. Ďalšou závislou premennou použitou v tejto testovacej metóde je výťažok, ktorý sa v niektorých krajinách môže vyžadovať na splnenie špecifických regulačných požiadaviek. Vymedzený je ako rozdiel množstva biomasy na konci expozície a množstva biomasy na jej začiatku. Z výťažku zaznamenaného v sérii testovacích roztokov sa vypočíta koncentrácia, ktorá spôsobuje špecifickú x % inhibíciu výťažku (napr. 50 %), a vyjadrí sa ako E_yC_x (napr. E_yC_{50}).

8. Okrem toho je možné štatisticky stanoviť najnižšiu koncentráciu s pozorovaným účinkom (LOEC), ako aj koncentráciu bez pozorovaného účinku (NOEC).

▼**M6**

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

9. Informácie o testovanej chemikálii, ktoré môžu byť užitočné pri stanovovaní testovacích podmienok, zahŕňajú štrukturálny vzorec, čistotu, svetelnú stálosť, stabilitu pri podmienkach testu, vlastnosti týkajúce sa absorpcie svetla, pKa a výsledky štúdií transformácie vrátane biodegradovateľnosti vo vode.

10. Známa by mala byť rozpustnosť vo vode, rozdeľovacia konštanta oktanol/voda (P_{ow}) a tlak pary testovanej chemikálie a k dispozícii by mala byť overená metóda kvantifikácie chemikálie v testovacích roztokoch so zaznamenanou výťažnosťou a detekčným limitom.

PLATNOSŤ TESTU

11. Test je platný, ak sú splnené tieto kritériá:

— Množstvo biomasy v kontrolných kultúrach by sa malo exponenciálne zvýšiť minimálne o faktor 16 počas 72 hodinového testu. To zodpovedá špecifickej rýchlosti rastu 0,92 deň$^{-1}$. V prípade najčastejšie používaných druhov je rýchlosť rastu zvyčajne podstatne vyššia (pozri dodatok 2). Toto kritérium sa nemusí splniť, ak sa používajú druhy, ktoré rastú pomalšie než druhy uvedené v dodatku 2. V tomto prípade by sa trvanie testu malo predĺžiť, aby sa dosiahol minimálne 16-násobný rast v kontrolných kultúrach, pričom počas trvania testu musí byť rast exponenciálny. Trvanie testu sa môže skrátiť najmenej na 48 hodín, aby sa zachoval neobmedzený exponenciálny rast počas testu, pokiaľ sa dosiahne minimálny multiplikačný faktor 16.

— Priemerný variačný koeficient pre špecifické fázové rýchlosti rastu (0. – 1. deň, 1. – 2. deň a 2. – 3. deň pre 72 hodinové testy) v kontrolných kultúrach (pozri dodatok 1 pod označením „variačný koeficient“) nesmie byť väčší ako 35 % Postup výpočtu špecifickej rýchlosti rastu po častiach je uvedený v bode 49. Toto kritérium platí pre strednú hodnotu variačných koeficientov vypočítanú pre replikáty kontrolných kultúr.

— Koeficient odchýlky priemerných špecifických rýchlostí rastu počas celého testu v paralelných kontrolných kultúrach nesmie byť väčší ako 7 % v testoch s druhmi *Pseudokirchneriella subcapitata* a *Desmodesmus subspicatus*. Pre iné druhy, zriedkavejšie používané na testovanie, nesmie hodnota presiahnuť 10 %.

REFERENČNÁ CHEMIKÁLIA

12. Referenčné chemikálie, ako napríklad 3,5-dichlórfenol, používané v medzinárodnej porovnávacej skúške (1) sa môžu testovať ako prostriedok kontroly postupu testu. Pre zelené riasy sa môže použiť ako referenčná chemikália aj dichróman draselný. Referenčnú chemikáliu je potrebné testovať najmenej dvakrát do roka.

POUŽITEĽNOSŤ TESTU

13. Táto testovacia metóda sa najľahšie používa pre chemikálie rozpustné vo vode, pri ktorých je pravdepodobné, že v podmienkach testu zostanú vo vode. V prípade testovania chemikálií, ktoré sú prchavé, silne sa adsorbujú,

▼M6

sú sfarbené, s nízkou rozpustnosťou vo vode, alebo chemikálií, ktoré môžu ovplyvniť dostupnosť živín alebo minerálnych látok v testovacom médiu, môžu byť potrebné určité modifikácie uvedeného postupu (napr. uzatvorený systém, úprava testovacích nádob). Usmernenia k niektorým vhodným úpravám sú uvedené v literatúre pod číslami (2) (3) a (4).

OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Zariadenie

14. Testovacie nádoby a ostatné zariadenia, ktoré prichádzajú do styku s testovacími roztokmi, by mali byť celé vyrobené zo skla alebo z iného chemicky inertného materiálu. Predmety by sa mali dôkladne umyť, aby sa zabezpečilo, že žiadne organické ani anorganické kontaminanty neovplyvnia rast rias ani zloženie testovacích roztokov.

15. Testovacími nádobami sú spravidla sklené banky s rozmermi, ktoré umožňujú dostačujúci objem kultúry pre merania počas testu a prenos dostatočného množstva CO_2 z atmosféry (pozri bod 30). Treba si uvedomiť, že objem kvapaliny musí byť postačujúci pre analytické stanovenia (pozri bod 37).

16. Okrem toho môžu byť potrebné niektoré z týchto zariadení alebo všetky tieto zariadenia:

— zariadenie na kultiváciu: odporúča sa nádoba alebo komora, v ktorej sa môže udržiavať zvolená inkubačná teplota s presnosťou ± 2 °C,

— prístroje na meranie svetla: je dôležité si uvedomiť, že metóda merania svietivosti a najmä typ receptora (kolektora) môže ovplyvniť nameranú hodnotu. Merania by sa mali prednostne vykonávať s použitím guľového (4 π) receptora (ktorý reaguje na priame a odrazené svetlo zo všetkých uhlov nad a pod rovinou merania) alebo 2 π receptora (ktorý reaguje na svetlo zo všetkých uhlov nad rovinou merania).

— Zariadenie na stanovenie množstva biomasy rias. Počet buniek, ktorý je najčastejšie používaným náhradným parametrom za biomasu rias, sa môže stanoviť s použitím elektronického počítadla častíc, mikroskopu s počítacou komorou alebo prietokového cytometra. Iné náhradné parametre za biomasu je možné merať použitím prietokového cytometra, fluorimetra, spektrofotometra alebo kolorimetra. Na výpočet je potrebný prepočítavací faktor vzťahujúci sa na počet buniek na sušinu. Na zabezpečenie potrebných meraní pri nízkych koncentráciách biomasy s použitím spektrofotometra môže byť potrebné použiť kyvety s dráhou svetla minimálne 4 cm.

Testované organizmy

17. Môžu sa použiť viaceré druhy voľne rastúcich mikrorias a siníc. Ukázalo sa, že kmene uvedené v dodatku 2 sú vhodné pre postup testovania uvedený v tejto testovacej metóde.

18. V prípade použitia iných druhov je potrebné uviesť v skúšobnom protokole kmeň a/alebo pôvod. Treba potvrdiť, že exponenciálny rast zvolenej testovanej riasy sa môže zachovať počas testu za obvyklých podmienok.

Rastové médium

19. Odporúčajú sa dve alternatívne rastové médiá – médium OECD a AAP. Zloženie týchto médií je uvedené v dodatku 3. Treba si uvedomiť, že počiatočná hodnota pH a tlmivá kapacita (ktorá reguluje zvyšovanie pH) dvoch médií je odlišná. Preto môžu byť výsledky testov rozdielne v závislosti od použitého média, najmä ak sa testujú ionizujúce chemikálie.

▼M6

20. Na určité účely môže byť potrebné modifikovať rastové médium, napríklad ak sa testujú kovy a chelatačné činidlá, alebo v prípade testovania pri rôznych hodnotách pH. Použitie modifikovaného média by sa malo podrobne opísať a odôvodniť (3) (4).

Počiatočná koncentrácia biomasy

21. Počiatočné množstvo biomasy v testovacích kultúrach musí byť rovnaké vo všetkých testovacích kultúrach a dostatočne nízke, aby umožnilo exponenciálny rast počas inkubácie bez rizika vyčerpania živín. Počiatočné množstvo biomasy by nemalo byť vyššie ako 0,5 mg/l, vyjadrené ako sušina. Odporúčajú sa tieto počiatočné koncentrácie buniek:

Pseudokirchneriella subcapitata:	$5 \times 10^3 – 10^4$ buniek/ml
Desmodesmus subspicatus	$2\text{-}5 \times 10^3$ buniek/ml
Navicula pelliculosa	10^4 buniek/ml
Anabaena flos-aquae	10^4 buniek/ml
Synechococcus leopoliensis	$5 \times 10^4 – 10^5$ buniek/ml

Koncentrácie testovanej chemikálie

22. Rozsah koncentrácií, v ktorých sa môžu účinky prejaviť, je možné stanoviť na základe výsledkov testov na vyhľadávanie rozsahu. Pre konečný definitívny test by sa malo zvoliť minimálne päť koncentrácií usporiadaných v geometrickom rade s faktorom maximálne 3,2. Pre testované chemikálie vykazujúce plochú krivku závislosti veličiny od koncentrácie sa môže zvoliť vyšší faktor. Séria koncentrácií by mala prednostne pokrývať rozsah 5 – 75 % inhibície rýchlosti rastu rias.

Replikáty a kontrolné kultúry

23. Test by sa mal vykonať s tromi replikátmi pri každej testovacej koncentrácii. Ak sa nevyžaduje stanovenie koncentrácie NOEC, môže sa test pozmeniť zvýšením počtu koncentrácií a znížením počtu replikátov na koncentráciu. Musia existovať minimálne tri kontrolné replikáty a teoreticky by sa mal použiť dvojnásobný počet replikátov pre každú testovaciu koncentráciu.

24. Pripraviť sa môže osobitný súbor testovacích roztokov na analytické stanovenie koncentrácie testovaných chemikálií (pozri body 36 a 38).

25. Ak sa na rozpustenie testovanej chemikálie používa rozpúšťadlo, musia sa do koncepcie testu zahrnúť ďalšie kontrolné kultúry obsahujúce rozpúšťadlo v rovnakej koncentrácii, aká sa používa v testovacích kultúrach.

Príprava inokula

26. Na prispôsobenie testovacích rias podmienkam skúšky, ako aj na zabezpečenie toho, aby sa riasy nachádzali v exponenciálnej fáze rastu v čase ich použitia na inokuláciu testovacích roztokov, sa pripraví inokulum v testovacom médiu 2 až 4 dni pred začiatkom skúšky. Biomasa rias by sa mala upraviť tak, aby sa v inokule umožnil exponenciálny rast do začiatku

▼M6

skúšky. Inokulum sa inkubuje za rovnakých podmienok ako testovacie kultúry. V inokule sa meria nárast množstva biomasy, aby sa zabezpečilo, že rast je v obvyklom rozsahu ako v prípade testovacieho kmeňa za podmienok kultivácie. Príklad postupu kultivácie rias je opísaný v dodatku 4. S cieľom zabrániť synchrónnemu deleniu buniek počas skúšky môže byť potrebný druhý stupeň množenia inokula.

Príprava testovacích roztokov

27. Všetky testovacie roztoky musia obsahovať rovnaké koncentrácie rastového média a počiatočného množstva biomasy testovanej riasy. Testovacie roztoky zvolených koncentrácií sa zvyčajne pripravujú zmiešaním zásobného roztoku testovanej chemikálie s rastovým médiom a inokulom. Zásobné roztoky sa spravidla pripravujú rozpustením chemikálie v testovacom médiu.

28. Rozpúšťadlá, napríklad acetón, *t*-butyl, alkohol a dimetylformamid, sa môžu použiť ako nosiče na pridávanie chemikálií s nízkou rozpustnosťou vo vode do testovacieho média (2) (3). Koncentrácia rozpúšťadla by nemala byť vyššia ako 100 µl/l a rovnaká koncentrácia rozpúšťadla by sa mala pridať do všetkých kultúr (vrátane kontrolných) v testovacej sérii.

Inkubácia

29. Testovacie nádoby sa uzavrú zátkami prepúšťajúcimi vzduch. Nádoby sa pretrepú a umiestnia do zariadenia na kultiváciu. Počas testu je potrebné ponechať riasy v suspenzii a umožniť prenos CO_2. Preto je potrebné nepretržité trepanie alebo miešanie. Kultúry by sa mali udržiavať pri teplote v rozsahu od 21 do 24 °C, s kontrolovanou presnosťou ± 2 °C. Pre iné druhy ako tie, ktoré sú uvedené v dodatku 2, napríklad tropické druhy, môžu byť vhodné vyššie teploty za predpokladu, že je možné splniť kritériá platnosti. Odporúča sa umiestniť banky náhodne a denne ich v inkubátore premiestňovať.

30. Počas testu by sa hodnota pH kontrolného média nemala zvýšiť o viac ako 1,5 jednotiek. Pre kovy a chemikálie, ktoré sa čiastočne ionizujú pri pH blízkom testovacej hodnote pH, môže byť potrebné limitovať kolísanie pH, aby sa získali reprodukovateľné a jednoznačné výsledky. Odchýlka < 0,5 pH je technicky možná a je možné ju dosiahnuť zabezpečením prísunu dostatočného množstva CO_2 z okolitého vzduchu do testovacieho roztoku napr. zvýšením rýchlosti trepania. Ďalšou možnosťou je znížiť spotrebu CO_2 znížením počiatočného množstva biomasy alebo skrátením dĺžky testu.

31. Priestor, kde sa kultúry inkubujú, by mal byť sústavne osvetlený rovnomerným fluorescenčným osvetlením napr. studeným bielym svetlom alebo denným svetlom. Kmene rias a siníc majú odlišné požiadavky na svetlo. Je potrebné zvoliť takú svietivosť, ktorá vyhovuje použitému testovaciemu organizmu. Pre odporúčané druhy zelených rias sa svietivosť zvolí na úrovni testovacích roztokov z rozsahu 60 – 120 · µE m^{-2} s^{-1} pri meraní vo fotosynteticky účinnom rozsahu vlnovej dĺžky 400 – 700 nm s použitím vhodného receptora. Niektoré druhy, najmä druh *Anabaena flos-aquae*, rastú dobre pri nižšej svietivosti a pri vysokej sa môžu poškodiť. Pre takéto druhy by sa mala zvoliť priemerná svietivosť v rozsahu od 40 do 60 µE m^{-2} s^{-1}. (V prípade prístrojov na meranie svetla kalibrovaných v luxoch zodpovedá príslušný rozsah 4 440 – 8 880 luxov pre studené biele svetlo približne odporúčanej intenzite svetla 60 – 120 µE m^{-2} s^{-1}.) Svietivosť udržujte v rozsahu ± 15 % priemernej svietivosti v priestore inkubácie.

▼M6

Dĺžka trvania testu

32. Test trvá spravidla 72 hodín. Môže sa však skrátiť alebo predĺžiť za predpokladu, že budú splnené všetky kritériá platnosti uvedené v bode 11.

Merania a analytické stanovenia

33. Počas trvania testu sa v každej banke minimálne jedenkrát za deň stanoví množstvo biomasy rias. Ak sa merania vykonávajú s malými objemami odobratými z testovacieho roztoku pipetou, netreba ich nahradiť.

34. Meranie množstva biomasy sa vykonáva manuálne počítaním buniek pomocou mikroskopu alebo elektronickým počítadlom častíc (ako počet buniek a/alebo biologický objem). Môžu sa použiť alternatívne techniky napr. prietoková cytometria, chlorofylová fluorescencia *in vitro* alebo *in vivo* (5) (6), alebo optická hustota, ak je možné na množstve biomasy vyskytujúcom sa v teste preukázať uspokojivú koreláciu s biomasou.

35. Meranie pH roztokov sa vykonáva na začiatku a na konci testu.

36. Ak je k dispozícii analytický postup na stanovenie testovanej chemikálie v použitom rozsahu koncentrácie, testovacie roztoky by sa mali analyzovať, aby sa overili počiatočné koncentrácie a zachovávanie expozičných koncentrácií počas testu.

37. Analýza koncentrácie testovanej chemikálie na začiatku a na konci testu nízkej a vysokej testovacej koncentrácie a koncentrácie okolo očakávanej hodnoty EC_{50} môže byť dostatočná, ak je pravdepodobné, že expozičné koncentrácie sa budú odlišovať o menej ako 20 % nominálnych hodnôt počas testu. Analýza všetkých testovacích koncentrácií na začiatku a na konci testu sa odporúča vtedy, al nie je pravdepodobné, že sa koncentrácie udržia v rozsahu od 80 do 120 % nominálnej koncentrácie. Pre prchavé, nestabilné alebo silne adsorbujúce testované chemikálie sa odporúča ďalší odber vzoriek na analýzu v 24 hodinových intervaloch počas expozície, aby sa lepšie stanovil úbytok testovanej chemikálie. Pre tieto chemické látky môžu byť potrebné ďalšie replikáty. Vo všetkých prípadoch je potrebné stanoviť koncentrácie testovanej chemikálie iba v jednej replikovanej nádobe na každú testovaciu koncentráciu (alebo na obsahy nádob rozdelené podľa replikátu).

38. S testovacím médiom pripraveným osobitne na analýzu expozičných koncentrácií počas testu by sa malo zaobchádzať rovnako ako s tými, ktoré sa používajú na testovanie, t. j. mali by sa inokulovať riasami a inkubovať za rovnakých podmienok. Ak sa vyžaduje analýza koncentrácie rozpustenej testovanej chemikálie, môže byť potrebné oddeliť riasy od média. Na separáciu by sa mala prednostne použiť centrifugácia pri nízkej hodnote g, dostatočnej na usadenie rias.

39. Ak je dokázané, že koncentrácia chemikálie, ktorá sa testuje, je počas testu v dostatočnej miere udržiavaná v rozsahu ± 20 % nominálnej hodnoty alebo nameranej počiatočnej koncentrácie, analýza výsledkov sa môže zakladať na nominálnych hodnotách alebo nameraných počiatočných hodnotách. Ak je odchýlka od nominálnej alebo nameranej počiatočnej koncentrácie väčšia ako ± 20 %, analýza výsledkov by mala byť založená na geometrickej strednej koncentrácii počas expozície alebo na modeloch opisujúcich pokles koncentrácie testovanej chemikálie (3) (7).

▼M6

40. Inhibičný test rastu rias je dynamickejším testovacím systémom ako väčšina iných krátkodobých testov toxicity pre vodné prostredie. V dôsledku toho môže byť zložité stanoviť skutočné expozičné koncentrácie, najmä pre adsorbujúce chemikálie testované pri nízkych koncentráciách. V takýchto prípadoch úbytok testovanej chemikálie z roztoku na základe adsorpcie s narastajúcim množstvom biomasy rias neznamená, že sa látka z testovacieho systému stratila. Pri analýze výsledku testu by sa malo skontrolovať, či zníženie koncentrácie testovanej chemikálie v priebehu testu sprevádza zníženie inhibície rastu. Ak áno, môže sa zvážiť použitie vhodného modelu, ktorý opisuje pokles koncentrácie testovanej látky (7). Ak nie, môže byť vhodné založiť analýzu výsledkov na počiatočných (nominálnych alebo nameraných) koncentráciách.

Ďalšie pozorovania

41. Na konci testu by sa malo vykonať mikroskopické pozorovanie na overenie normálneho a zdravého vzhľadu inokula a na zistenie akéhokoľvek neobvyklého vzhľadu rias (čo môže byť zapríčinené expozíciou testovanej chemikálie).

Limitný test

42. V určitých situáciách, napríklad keď z predbežného testu vyplýva, že testovaná chemikália nemá žiadne toxické účinky pri koncentráciách do 100 mg/l alebo do jej limitu rozpustnosti v testovacom médiu (podľa toho, ktorá hodnota je nižšia), sa môže vykonať limitný test umožňujúci porovnanie reakcií v kontrolnej skupine a jednej skupine s aplikovanou chemikáliou (100 mg/l alebo koncentrácia rovná limitu rozpustnosti). Dôrazne sa odporúča, aby sa táto skutočnosť zakladala na analýze expozičnej koncentrácie. Na limitný test sa vzťahujú všetky už uvedené testovacie podmienky a kritériá platnosti s výnimkou, že počet replikátov s aplikovanou chemikáliou by mal byť minimálne šesť. Závislé premenné reakcie v kontrolnej skupine a skupine s aplikovanou chemikáliou sa môžu analyzovať použitím štatistického testu na porovnanie stredných hodnôt, napríklad Studentovho t-testu. Ak variancie v obidvoch skupinách nie sú rovnaké, je potrebné vykonať t-test upravený na nerovnaké rozptyly.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Vytvorenie rastových kriviek

43. Množstvo biomasy v testovacích nádobách môže byť vyjadrené v jednotkách náhradného parametra použitého na meranie (napr. počet buniek, fluorescencia).

44. Na vytvorenie rastových kriviek je potrebné usporiadať do tabuľky odhadnuté koncentrácie biomasy v testovacích kultúrach a kontrolných kultúrach spolu s koncentráciami testovaného materiálu a časmi merania zaznamenanými s rozlíšením minimálne na celé hodiny. V tomto prvom štádiu môžu byť užitočné obidve stupnice, logaritmická aj lineárna, ale logaritmická stupnica je povinná a spravidla lepšie vyjadruje parametre charakterizujúce rast počas trvania testu. Treba si uvedomiť, že exponenciálny rast je vyjadrený priamkou, ak sa vytvorí na logaritmickej stupnici, a že sklon priamky (strmosť) označuje špecifickú rýchlosť rastu.

45. Grafické znázornenie slúži na kontrolu, či kontrolné kultúry počas testu rastú exponenciálne pri predpokladanej rýchlosti rastu. Je potrebné kriticky preskúmať všetky dátové body a podobu diagramov a skontrolovať prvotné údaje a postupy, aby sa zistili možné chyby. Skontrolovať treba najmä všetky dátové body, ktorých odchýlky sa zdajú byť spôsobené systematickou chybou. Ak je zrejmé, že chyby v postupe je možné zistiť a/alebo sa pokladajú za vysoko pravdepodobné, konkrétny dátový bod sa označí ako

▼M6

extrémna hodnota a nezahrnie sa do následnej štatistickej analýzy. (Nulová koncentrácia rias v jednej z dvoch alebo troch replikovaných nádob môže naznačovať, že nádoba nebola správne inokulovaná alebo nebola riadne vyčistená.) Dôvody na vyradenie dátového bodu ako extrémnej hodnoty je potrebné jasne uviesť v skúšobnom protokole. Prípustným dôvodom sú iba (zriedkavé) chyby v postupe a nie nepresnosť. Štatistické postupy v prípade identifikácie extrémnych hodnôt majú obmedzené použitie pre tento typ problému a nemôžu nahradiť odborné posúdenie. Extrémne hodnoty (takto označené) sa musia prednostne ponechať medzi dátovými bodmi uvedenými v každej ďalšej grafickej alebo tabuľkovej prezentácii údajov.

Premenné hodnoty reakcie

46. Účelom testu je stanoviť účinky testovanej chemikálie na rast rias. Táto testovacia metóda opisuje dve premenné hodnoty reakcie, keďže rôzne jurisdikcie majú rozdielne preferencie a regulačné požiadavky. Na to, aby boli výsledky testu prijateľné vo všetkých jurisdikciách, by sa účinky mali hodnotiť s použitím obidvoch uvedených závisle premenných reakcie a) a b).

a) Priemerná špecifická rýchlosť rastu: táto premenná hodnota reakcie sa vypočíta na základe logaritmického nárastu množstva biomasy počas testu vyjadreného za deň.

b) Výťažok: táto závisle premenná reakcie predstavuje rozdiel množstva biomasy na konci testu a počiatočného množstva biomasy.

47. Je potrebné si uvedomiť, že hodnoty toxicity vypočítané použitím týchto dvoch závisle premenných veličín reakcie nie sú porovnateľné a tento rozdiel sa musí zohľadniť pri použití výsledkov testu. Pri dodržaní testovacích podmienok tejto testovacej metódy budú hodnoty EC_x založené na priemernej špecifickej rýchlosti rastu (E_rC_x) spravidla vyššie ako výsledky založené na výťažku (E_yC_x), a to v dôsledku matematického základu príslušných postupov. Nemalo by sa to vysvetľovať ako rozdiel v citlivosti medzi obidvoma závisle premennými veličinami reakcie, ale len tak, že sa hodnoty odlišujú matematicky. Koncepcia priemernej špecifickej rýchlosti rastu sa zakladá na všeobecnom exponenciálnom modeli rastu rias v nelimitovaných kultúrach, kde sa toxicita stanovuje na základe účinkov na rýchlosť rastu, bez závislosti od absolútnej úrovne špecifickej rýchlosti rastu kontrolnej kultúry, od sklonu krivky grafu reakcie a koncentrácie alebo od dĺžky testu. Naopak je to v prípade výsledkov založených na závisle premennej veličine výťažku, ktoré sú závislé od všetkých ďalších premenných. Hodnota E_yC_x je závislá od špecifickej rýchlosti rastu druhov rias, ktoré sa používajú v každom teste, a od maximálnej špecifickej rýchlosti rastu, ktorá sa môže meniť medzi druhmi a dokonca aj medzi rozdielnymi kmeňmi rias. Táto závisle premenná veličina by sa nemala používať na porovnávanie citlivosti na toxické látky medzi druhmi rias alebo dokonca odlišnými kmeňmi. Zatiaľ čo z vedeckého hľadiska sa na odhady toxicity uprednostňuje použitie priemernej špecifickej rýchlosti rastu, do tejto testovacej metódy bolo zahrnuté aj stanovenie toxicity na základe výťažku, aby sa tak vyhovelo regulačným požiadavkám platným v niektorých krajinách.

Priemerná rýchlosť rastu

48. Priemerná špecifická rýchlosť rastu pre konkrétny čas sa vypočíta ako logaritmus nárastu množstva biomasy z rovnice pre každú jednotlivú kontrolnú nádobu a nádobu s aplikovanou chemikáliou [1]:

▼M6

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{deň}^{-1}) \qquad [1],$$

kde:

μ_{i-j} je priemerná špecifická rýchlosť rastu od času i do j,

X_i je množstvo biomasy v čase i,

X_j je množstvo biomasy v čase j.

Pre každú skupinu s aplikovanou chemikáliou a kontrolnú skupinu sa vypočíta stredná hodnota rýchlosti rastu spolu s odhadmi rozptylu.

49. Vypočíta sa priemerná špecifická rýchlosť rastu počas celej dĺžky testu (spravidla 0. – 3. deň), a to radšej s použitím nominálne inokulovanej biomasy ako počiatočnej hodnoty, než s použitím nameranej počiatočnej hodnoty, lebo sa tak spravidla dosiahne väčšia presnosť. Ak zariadenie použité na meranie biomasy umožňuje dostatočne presné stanovenie malého množstva inokula biomasy (napr. prietokový cytometer), potom sa môže použiť nameraná počiatočná koncentrácia biomasy. Stanoví sa tiež rýchlosť rastu po častiach výpočtom špecifických rýchlostí rastu pre každý deň počas testu (0. – 1. deň, 1. – 2. deň a 2. – 3. deň) a treba overiť, či je kontrolná rýchlosť rastu naďalej konštantná (pozri kritériá platnosti v bode 11). Výrazne nižšia špecifická rýchlosť rastu v deň 1 ako celková priemerná špecifická rýchlosť rastu môže indikovať lag fázu. Zatiaľ čo v kontrolných kultúrach je možné lag fázu minimalizovať a prakticky eliminovať vhodným namnožením prípravnej kultúry, lag fáza v exponovaných kultúrach môže indikovať regeneráciu po pôvodnom toxickom strese alebo zníženú expozíciu v dôsledku úbytku testovanej chemikálie (vrátane sorpcie na biomasu rias) po počiatočnej expozícii. Môže sa teda stanoviť rýchlosť rastu po častiach na vyhodnotenie účinkov testovanej látky, ktoré sa vyskytnú počas expozície. Zo značných rozdielov medzi fázovou rýchlosťou rastu a priemernou rýchlosťou rastu vyplýva odchýlka od konštantného exponenciálneho rastu, ako aj skutočnosť, že bolo zaručené dôkladné preskúmanie rastových kriviek.

50. Inhibícia rýchlosti rastu v percentách pre každý replikát s aplikovanou chemikáliou sa vypočíta pomocou rovnice [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \qquad [2],$$

kde:

$\%\ I_r$ = percentuálna hodnota inhibície priemernej špecifickej rýchlosti rastu,

μ_C = stredná hodnota priemernej špecifickej rýchlosti rastu (μ) v kontrolnej skupine,

μ_T = priemerná špecifická rýchlosť rastu pre replikát s aplikovanou chemikáliou.

51. Ak sa na prípravu testovacích roztokov použijú rozpúšťadlá, vo výpočte percentuálnej inhibície by sa mali použiť skôr kontrolné roztoky s rozpúšťadlom než kontrolné roztoky bez rozpúšťadiel.

Výťažok

52. Výťažok sa vypočíta ako rozdiel množstva biomasy na konci testu a počiatočného množstva biomasy pre každú jednotlivú kontrolnú nádobu a nádobu s aplikovanou chemikáliou. Pre každú testovanú koncentráciu a kontrolnú vzorku sa vypočíta stredná hodnota výťažku spolu s odhadmi rozptylu. Percentuálna inhibícia výťažku ($\%\ I_y$) sa môže vypočítať pre každý replikát s aplikovanou chemikáliou takto:

▼M6

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \quad [3]$$

kde:

% I_y = percentuálna inhibícia výťažku,

Y_C = stredná hodnota výťažku v kontrolnej skupine,

Y_T = hodnota výťažku pre replikát s aplikovanou chemikáliou.

Vytvorenie krivky reakcie na koncentráciu

53. Vytvorí sa diagram závislosti percenta inhibície od logaritmu koncentrácie testovanej chemikálie. Diagram je potrebné pozorne skontrolovať a nebrať do úvahy žiadny dátový bod, ktorý bol vylúčený v prvej fáze ako extrémna hodnota. Dátové body sa spoja súvislou čiarou, buď voľne, alebo pomocou počítačovej interpolácie, čím sa získajú prvé poznatky o vzťahu medzi koncentráciou a reakciou, a ďalej sa postupuje presnejšou metódou, prednostne počítačovou štatistickou metódou. V závislosti od plánovaného využitia údajov, kvality (presnosti) a množstva údajov, ako aj dostupnosti nástrojov na analýzu údajov je možné rozhodnúť (niekedy celkom správne) o zastavení analýzy údajov v tomto štádiu a potom jednoducho odčítať kľúčové hodnoty EC_{50} a EC_{10} (a/alebo EC_{20}) z voľne zostrojenej krivky (pozri tiež ďalšiu časť o stimulačných účinkoch). Platné dôvody na nepoužitie štatistickej metódy môžu byť takéto:

— údaje nie sú vhodné pre počítačové metódy, ktoré by poskytli spoľahlivejšie výsledky, aké je možné získať odborným posúdením – za takýchto okolností niektoré počítačové programy môžu dokonca poskytnúť nesprávne riešenie (iterácie nemusia konvergovať atď.).

— Reakcie stimulovaného rastu nie je možné náležite spracovať s použitím dostupných počítačových programov (pozri ďalej).

Štatistické postupy

54. Cieľom je získať kvantitatívny vzťah medzi koncentráciou a reakciou pomocou regresnej analýzy. Je možné použiť váženú lineárnu regresiu po vykonaní linearizovanej transformácie reakčných údajov – napríklad na probitové alebo logitové, prípadne Weibullove jednotky (8), ale uprednostňujú sa techniky nelineárnej regresie, ktorými sa lepšie spracujú nevyhnutné nepresnosti údajov a odchýlky od hladkých rozdelení. Priblížením buď k nulovej, alebo k úplnej inhibícii sa takéto nepresnosti môžu transformáciou zväčšiť a ovplyvniť analýzu (8). Je potrebné si uvedomiť, že štandardné metódy analýzy s použitím probitovej, logitovej alebo Weibullovej transformácie sú určené na použitie na kvantálne údaje (napr. o mortalite alebo prežití) a musia sa modifikovať, aby sa prispôsobili údajom o raste alebo biomase. Osobitné postupy na stanovenie hodnôt ECx z kontinuálnych údajov je možné nájsť v literatúre pod číslami (9) (10) a (11). Ďalšie podrobnosti o použití nelineárnej regresnej analýzy sú uvedené v dodatku 5.

55. Pre každú závisle premennú veličinu reakcie, ktorá sa má analyzovať, sa na výpočet bodových odhadov hodnôt ECx použije vzťah medzi koncentráciou a reakciou. Ak je to možné, je potrebné stanoviť 95 % hranice spoľahlivosti pre každý odhad. Vhodnosť reakčných údajov pre regresný model je potrebné vyhodnotiť buď graficky, alebo štatisticky. Regresná analýza sa

▼M6

musí vykonať s použitím reakcií jednotlivých replikátov, nie stredných hodnôt skupiny s aplikovanou chemikáliou. Ak je však zostrojenie nelineárnej krivky zložité alebo nemožné pre príliš veľký rozptyl údajov, problému je možné sa vyhnúť vykonaním regresie na skupinovom základe ako praktický spôsob zníženia vplyvu podozrivých extrémnych hodnôt. Použitie tejto možnosti by sa malo uviesť v protokole o skúške ako odchýlka od obvyklého postupu, keďže krivky zostrojené s jednotlivými replikátmi nepriniesli dobrý výsledok.

56. Odhady hodnôt EC_{50} a hranice spoľahlivosti sa môžu získať aj použitím lineárnej interpolácie metódou „bootstrap“ (13), ak sú dostupné regresné modely/metódy nevhodné pre dané údaje.

57. Pre odhad koncentrácií LOEC aj NOEC v prípade účinkov testovanej chemikálie na rýchlosť rastu je potrebné porovnať stredné hodnoty skupiny s aplikovanou chemikáliou pomocou techník na analýzu rozptylu (ANOVA). Stredná hodnota pre každú koncentráciu sa musí potom porovnať s kontrolnou strednou hodnotou s použitím príslušného viacnásobného porovnania alebo testovacej metódy trendu. Môže sa použiť Dunnettov alebo Williamsov test (12) (14) (15) (16) (17). Je potrebné posúdiť, či je dodržaný predpoklad homogenity rozptylu ANOVA. Toto posúdenie sa môže vykonať graficky alebo formálnym testom (17). Vhodný je Levenov alebo Bartlettov test. Nesplnenie predpokladu homogenity rozptylov je niekedy možné korigovať logaritmickou transformáciou údajov. Ak je heterogenita rozptylu extrémna a nie je možné ju korigovať transformáciou, je potrebné posúdiť analýzu metódami, ako sú napríklad „step-down Jonkheere“ testy trendu. Ďalšie informácie o stanovení hodnoty NOEC je možné nájsť v literatúre pod číslom (11).

58. Najnovší vývoj vo vede vedie k odporúčaniu upustiť od koncepcie NOEC a nahradiť ju regresiou založenou na bodovom odhade ECx. Príslušná hodnota x pre tento test na riasach nebola stanovená. Vhodný sa zdá byť rozsah 10 – 20 % (v závislosti od zvolenej závisle premennej veličiny reakcie), pričom prednostne by sa mali uvádzať hodnoty EC_{10} a EC_{20}.

Stimulácia rastu

59. Niekedy sa pri nízkych koncentráciách pozoruje stimulácia rastu (negatívna inhibícia). Môže to byť dôsledok hormézy („toxickej stimulácie“) alebo pridania stimulujúcich rastových faktorov s testovaným materiálom do použitého minimálneho média. Treba si uvedomiť, že pridanie anorganických živín by nemalo mať žiadny priamy účinok, keďže testovacie médium by si počas celého testu malo zachovávať nadbytok živín. Stimuláciu pri nízkych dávkach je možné pri výpočtoch EC_{50} zvyčajne ignorovať, pokiaľ nie je extrémna. Ak je však stimulácia extrémna alebo sa má vypočítať hodnota ECx pre nízke x, môžu byť potrebné osobitné postupy. Ak je to možné, malo by sa zabrániť vypusteniu stimulačných reakcií z analýzy údajov, a ak dostupný softvér na vytvorenie krivky nemôže prijať malú stimuláciu, môže sa použiť lineárna interpolácia metódou „bootstrap“. Ak je stimulácia extrémna, môže sa zvážiť model hormézy (18).

Netoxická inhibícia rastu

60. Testovacie materiály absorbujúce svetlo môžu spôsobiť zníženie rýchlosti rastu, keďže tienenie znižuje množstvo dostupného svetla. Takéto fyzikálne typy účinkov je potrebné oddeliť od toxických účinkov modifikáciou podmienok testu, a to je potrebné osobitne uviesť v skúšobnom protokole. Usmernenie je možné nájsť v literatúre pod číslami (2) a (3).

PROTOKOL O SKÚŠKE

61. Skúšobný protokol musí obsahovať tieto informácie:

▼**M6**

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti vrátane limitu rozpustnosti vo vode,

— identifikačné údaje chemikálie (napr. číslo CAS) vrátane čistoty (nečistôt).

Testovacie druhy:

— kmeň, dodávateľ alebo zdroj a použité podmienky kultivácie.

Podmienky testu:

— dátum začiatku testu a jeho dĺžka,

— opis koncepcie testu: testovacie nádoby, objemy kultúr, hustota biomasy na začiatku testu,

— zloženie média,

— testovacie koncentrácie a replikáty (napr. počet replikátov, počet testovacích koncentrácií a použitý geometrický rad),

— opis prípravy testovacích roztokov vrátane použitia rozpúšťadiel atď.,

— zariadenie na kultiváciu,

— intenzita svetla a kvalita (zdroj, homogenita),

— teplota,

— testované koncentrácie: nominálne testované koncentrácie a všetky výsledky analýz na stanovenie koncentrácie testovanej chemikálie v testovacích nádobách. V správe sa musí uviesť výťažnosť a kvantifikačný limit v testovacom matrixe,

— všetky odchýlky od tejto testovacej metódy,

— metóda na stanovenie množstva biomasy a dôkaz korelácie medzi meraným parametrom a sušinou.

Výsledky:

— hodnoty pH na začiatku a na konci testu pri všetkých aplikáciách chemickej látky,

— množstvo biomasy v každej banke v každom meranom bode a metóda merania množstva biomasy,

— rastové krivky (diagram závislosti množstva biomasy od času),

— vypočítané hodnoty závisle premenných veličín reakcie pre každý replikát s aplikovanou chemikáliou, so strednými hodnotami a s variačným koeficientom pre replikáty,

— grafické znázornenie vzťahu koncentrácie a účinku,

▼**M6**

— odhady toxicity pre závisle premenné veličiny reakcie napr. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, a príslušné intervaly spoľahlivosti. hodnoty LOEC a NOEC a štatistické metódy použité na ich stanovenie v prípade, že sa vypočítavajú,

— ak sa používa technika ANOVA, veľkosť účinku, ktorý je možné detegovať (napr. najmenej významný rozdiel),

— každá stimulácia rastu zistená v ľubovoľnej vzorke s aplikovanou chemikáliou,

— všetky iné pozorované účinky, napríklad morfologické zmeny rias,

— rozbor výsledkov vrátane každého vplyvu na výsledok testu vyplývajúceho z odchýlok od tejto testovacej metódy.

LITERATÚRA

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

Dodatok 1

Vymedzenia pojmov

Na účely tejto testovacej metódy sa používajú tieto pojmy a skratky:

Biomasa je suchá hmotnosť živej hmoty nachádzajúcej sa v populácii, vyjadrenej ako daný objem, napríklad mg rias/liter testovacieho roztoku, napr. mg rias/liter testovacieho roztoku. „Biomasa“ je zvyčajne vymedzená ako hmotnosť, ale v tomto teste sa uvedené slovo používa na vyjadrenie hmotnosti na objem. V tomto teste sa bežne merajú aj náhradné parametre biomasy ako napríklad počet buniek, fluorescencia atď., a teda používanie pojmu „biomasa“ sa vzťahuje aj na tieto náhradné parametre.

Chemikália je látka alebo zmes.

Variačný koeficient (VK) je bezrozmerná hodnota premenlivosti parametra vymedzená ako pomer štandardnej odchýlky k strednej hodnote. Môže byť vyjadrená aj ako percentuálna hodnota. Stredný variačný koeficient priemernej špecifickej rýchlosti rastu sa v repilátoch kontrolných kultúr počíta takto:

1. pre príslušné replikáty sa vypočíta percentuálna hodnota VK priemernej špecifickej rýchlosti rastu na základe denných/fázových rýchlostí rastu,

2. vypočíta sa stredná hodnotu zo všetkých hodnôt vypočítaných v bode 1, čím sa získa stredný variačný koeficient špecifickej dennej/fázovej rýchlosti rastu v replikátoch kontrolných kultúr.

EC_x je koncentrácia testovanej chemikálie rozpustenej v testovacom médiu, ktorej dôsledkom je x % (napr. 50 %) zníženie rastu testovacieho organizmu v rámci stanoveného času expozície (je potrebné výslovne uviesť, ak sa odchyľuje od celkovej alebo bežnej dĺžky testu). Na jednoznačné označenie hodnoty EC odvodenej z rýchlosti rastu alebo výťažku sa používa symbol „E_rC“ pre rýchlosť rastu a symbol „E_yC“ pre výťažok.

Rastové médium je kompletné syntetické kultivačné médium, v ktorom rastie testovaná riasa vystavená pôsobeniu testovanej chemikálie. Testovaná chemikália sa spravidla rozpustí v testovacom médiu.

Rýchlosť rastu (priemerná špecifická rýchlosť rastu) je logaritmickým nárastom množstva biomasy počas expozície.

Najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC) je najnižšia testovacia koncentrácia, pri ktorej sa pozoruje, že chemikália má štatisticky významný účinok na zníženie rastu (pri $p < 0,05$) v porovnaní s kontrolnou kultúrou v rámci daného času expozície. Škodlivý účinok všetkých testovacích koncentrácií nad LOEC však musí byť vždy rovnaký alebo väčší ako účinky pozorované pri LOEC. Ak nie sú splnené tieto dve podmienky, je potrebné poskytnúť úplné vysvetlenie, akým spôsobom sa zvolila koncentrácia LOEC (a teda aj koncentrácia NOEC).

Koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC) je testovacia koncentrácia bezprostredne pod koncentráciou LOEC.

Závislé premenná veličina reakcie je premenná na odhad toxicity odvodená z akýchkoľvek meraných parametrov opisujúcich biomasu rôznymi metódami výpočtu. V prípade tejto testovacej metódy sú rýchlosti rastu a výťažok závisle premennými veličinami reakcie odvodenými priamo z merania množstva biomasy alebo uvedených náhradných parametrov.

▼**M6**

Špecifická rýchlosť rastu je premenná hodnota reakcie vymedzená ako kvocient rozdielu prirodzených logaritmov parametra pozorovania (v rámci tejto testovacej metódy biomasy) a príslušného časového intervalu.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Výťažok je rozdiel hodnoty meranej premennej na konci expozície a hodnoty meranej premennej na jej začiatku, ktorý vyjadruje nárast množstva biomasy počas testu.

▼M6

Dodatok 2

Kmene, ktoré sa ukázali ako vhodné na účely testu

Zelené riasy

Pseudokirchneriella subcapitata (predtým známa ako *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, SAG 61.81

Desmodesmus subspicatus (predtým známa ako *Scenedesmus subspicatus*), SAG 86.81

Rozsievky

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Sinice

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Zdroje kmeňov

Odporúčané kmene sú dostupné z kultúr s jedným druhom rias z týchto zbierok (v abecednom poradí)

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
VEĽKÁ BRITÁNIA

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Göttingen
NEMECKO

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

Vzhľad a charakteristika odporúčaných druhov

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Vzhľad	zakrivené, skrútené samostatné bunky	oválne, väčšinou samostatné bunky	tyčinky	reťazce oválnych buniek	tyčinky
Veľkosť (dĺžka × šírka) µm	8 – 14 × 2 – 3	7 – 15 × 3 – 12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Objem buniek (v μm^3 na bunku)	40 – 60 (1)	60 – 80 (1)	40 – 50 (1)	30 – 40 (1)	2,5 (2)
Sušina buniek (v mg na bunku)	$2 – 3 \times 10^{-8}$	$3 – 4 \times 10^{-8}$	$3 – 4 \times 10^{-8}$	$1 – 2 \times 10^{-8}$	$2 – 3 \times 10^{-9}$
Rýchlosť rastu (3) ($deň^{-1}$)	1,5 – 1,7	1,2 – 1,5	1,4	1,1 – 1,4	2,0 – 2,4

(1) Merané elektronickým počítadlom častíc.
(2) Vypočítané z veľkosti.
(3) Najčastejšie pozorovaná rýchlosť rastu v OECD médiu s intenzitou svetla približne 70 µE m^{-2} s^{-1} a 21 °C.

Osobitné odporúčania pre kultiváciu a zaobchádzanie s odporúčanými testovacími druhmi

Pseudokirchneriella subcapitata a Desmodesmus subspicatus

Tieto zelené riasy sa spravidla ľahko uchovávajú v rôznych kultivačných médiách. Informácie týkajúce sa vhodných médií sú dostupné zo zbierok kultúr. Bunky sú spravidla samostatné, bunková hustota sa stanovuje jednoducho s použitím elektronického počítadla častíc alebo mikroskopu.

Anabaena flos-aquae

Na uchovávanie zásobnej kultúry sa môžu použiť rôzne rastové médiá. Je mimoriadne dôležité, aby sa pri obnovovaní zabránilo jednorazovej kultúre prekročiť log fázu rastu, v tomto bode je obnova zložitá.

Anabaena flos-aquae vytvára zhluky spletených reťazcov buniek. Veľkosť týchto zhlukov sa môže meniť podľa podmienok kultivácie. Môže byť potrebné rozdeliť tieto zhluky, ak sa na stanovenie množstva biomasy použije počítanie pomocou mikroskopu alebo elektronického počítadla častíc.

Môže sa použiť sonifikácia čiastkových vzoriek na rozbitie reťazcov, aby sa znížila variabilita počtu buniek. Dlhšia sonifikácia, ako sa vyžaduje na rozbitie reťazcov na kratšie úseky, môže poškodiť bunky. Intenzita sonifikácie a jej trvanie musia byť rovnaké pri každom spracovaní.

Je potrebné spočítať dostatočné množstvo políčok na hemocytometri (minimálne 400 buniek) na elimináciu variability. Tým sa zlepší spoľahlivosť mikroskopického stanovenia hustoty.

Elektronické počítadlo častíc sa môže použiť na stanovenie celkového objemu buniek rodu Anabaena po rozbití reťazcov buniek opatrnou sonifikáciou. Je potrebné prispôsobiť silu sonifikácie, aby sa zabránilo rozbitiu buniek.

Použite vortexový mixér alebo podobnú vhodnú metódu na zabezpečenie toho, aby suspenzia rias, ktorá sa použije na inokuláciu testovacích nádob, bola dobre premiešaná a homogénna.

▼**M6**

Testovacie nádoby by sa mali umiestniť na orbitálnu trepačku s platformou približne pri 150 otáčkach za minútu. Alternatívne sa môže použiť občasné miešanie na zníženie tvorby zhlukov rodu *Anabaena*. Ak sa vyskytne zhlukovanie, je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa dosiahli reprezentatívne vzorky na stanovenie množstva biomasy. Môže byť potrebné prudké premiešanie pred odberom vzoriek, aby sa rozbili zhluky rias.

Synechococcus leopoliensis

Na uchovávanie zásobnej kultúry sa môžu použiť rôzne rastové médiá. Informácie týkajúce sa vhodných médií sú dostupné zo zbierok kultúr.

Synechococcus leopoliensis rastie vo forme samostatných tyčinkovitých buniek. Bunky sú veľmi malé, čo sťažuje použitie počítania pomocou mikroskopu pri meraniach množstva biomasy. Užitočné sú elektronické počítadlá častíc vybavené na počítanie menších častíc až veľkosti približne 1 μm. Vhodné sú tiež fluorometrické merania *in vitro*.

Navicula pelliculosa

Na uchovávanie zásobnej kultúry sa môžu použiť rôzne rastové médiá. Informácie týkajúce sa vhodných médií sú dostupné zo zbierok kultúr. Treba si uvedomiť, že do média je potrebné pridať kremičitan.

Navicula pelliculosa môže v určitých rastových podmienkach vytvárať zhluky. Z dôvodu tvorby lipidov majú bunky rias niekedy tendenciu akumulovať sa vo forme povrchového filmu. Za týchto okolností je potrebné prijať osobitné opatrenia pri odoberaní čiastkových vzoriek na stanovenie množstva biomasy, aby bolo možné získať reprezentatívne vzorky. Môže byť potrebné prudké premiešanie napr. použitím vortexového mixéra.

▼**M6**

Dodatok 3

Rastové médiá

Môže sa použiť jedno z týchto rastových médií:

— médium OECD: pôvodné médium OECD TG 201, tiež podľa ISO 8692,

— US. EPA médium AAP, tiež podľa ASTM.

Pri príprave týchto médií sa musia použiť reagenty alebo chemikálie analytickej kvality a deionizovaná voda.

Zloženie média AAP (U.S. EPA) a média OECD TG 201.

Zložka	AAP		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	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	

Molárny pomer EDTA a železa je mierne vyšší ako jeden. Zabraňuje to vyzrážaniu železa a zároveň sa minimalizuje chelácia ťažkých kovov.

V teste s rozsievkou *Navicula pelliculosa* sa musí k obidvom médiám pridať $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$, aby sa dosiahla koncentrácia 1,4 mg Si/l.

▼**M6**

Príslušná hodnota pH média sa dosiahne rovnováhou medzi uhličitanovým systémom média a parciálnym tlakom CO_2 v okolitom vzduchu. Približný vzťah medzi pH pri 25 °C a molárnou koncentráciou hydrogenuhličitanu je:

$pH_{eq} = 11{,}30 + \log[HCO_3]$

pri 15 mg $NaHCO_3$/l, pHeq = 7,5 (U.S. EPA médium) alebo pri 50 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 8,1 (médium OECD).

Zloženie prvkov v testovacom médiu

Prvok	AAP	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Príprava média OECD

Živina	Koncentrácia v zásobnom roztoku
Zásobný roztok 1: makroživiny	
NH_4Cl	1,5 g/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Zásobný roztok 2: železo	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
Zásobný roztok 3: stopové prvky	
H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l

▼**M6**

Živina	Koncentrácia v zásobnom roztoku
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
Zásobný roztok 4: hydrogénuhličitan	
$NaHCO_3$	50 g/l
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Zásobné roztoky sa sterilizujú membránovou filtráciou (stredný priemer pórov 0,2 μm) alebo autoklávovaním (120 °C, 15 min). Roztoky sa skladujú v tme pri teplote 4 °C.

Zásobné roztoky 2 a 4 sa neautoklávujú, ale sterilizujú membránovou filtráciou.

Rastové médium sa pripraví pridaním príslušného objemu zásobných roztokov 1 až 4 do vody:

do 500 ml sterilizovanej vody sa pridá:

10 ml zásobného roztoku 1,

1 ml zásobného roztoku 2,

1 ml zásobného roztoku 3,

1 ml zásobného roztoku 4.

Doplní sa sterilizovanou vodou do 1 000 ml.

Je potrebné poskytnúť dostatočný čas na vyrovnanie média s atmosférickým CO_2, v prípade potreby niekoľkohodinovým prebublávaním sterilným filtrovaným vzduchom.

Príprava U.S. EPA média AAP

1. Do približne 900 ml deionizovanej alebo destilovanej vody sa pridá 1 ml každého zásobného roztoku v *2.1 – 2.7* a potom sa zriedi na 1 liter.

2. Zásobné roztoky makroživín sa pripravujú rozpustením týchto látok v 500 ml deionizovanej alebo destilovanej vody. Reagenty *2.1, 2.2, 2.3* a *2.4* sa môžu spojiť do jedného zásobného roztoku.

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	Zásobný roztok mikroživín (pozri 3)	
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	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	Pozri poznámku 1.

▼**M6**

Poznámka 1: Používa sa iba pre testovacie druhy rozsievok. Môže sa pridať priamo (202,4 mg) alebo prostredníctvom zásobného roztoku, aby sa dosiahla konečná koncentrácia Si v médiu 20 mg/l.

3. Zásobný roztok mikroživín sa pripravuje rozpustením týchto látok v 500 ml deionizovanej alebo destilovanej vody:

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 · $2H_2O$	3,630 mg.	
3,7	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,006 mg.	
3,8	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	150,000 mg.	[dinátrium (etyléndinitrilo) tetraacetát].
3,9	$Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$	0,005 mg	pozri poznámku 2.

Poznámka 2: Používa sa iba v médiu pre zásobné roztoky kultúry druhov rozsievok.

4. Hodnota pH sa upraví na 7,5 ± 0,1 pridaním 0,1 *N* alebo 1,0 *N* NaOH alebo HCl.

5. Médium sa prefiltruje do sterilnej nádoby cez 0,22 μm membránový filter, ak sa má používať počítač častíc, alebo cez 0,45 μm filter v prípade, že sa počítač častíc nepoužíva.

6. Médium sa až do použitia skladuje v tme pri teplote približne 4 °C.

▼M6

Dodatok 4

Vzor postupu kultivácie rias

Všeobecné pozorovania

Účelom kultivácie podľa tohto postupu je získať kultúry rias na testovanie toxicity.

Musia sa použiť vhodné metódy na zabezpečenie toho, aby kultúry rias neboli infikované baktériami. Axenické kultúry môžu byť vhodné, ale potrebné je vytvoriť a používať kultúry s jedným druhom rias.

Všetky činnosti by sa mali vykonávať v sterilných podmienkach, aby sa zamedzilo kontaminácii baktériami a inými riasami.

Zariadenia a materiály

Pozri v časti Testovacia metóda: Zariadenia.

Postupy na získanie kultúr rias

Príprava živných roztokov (médií):

Všetky živné soli média sa pripravia ako koncentrované zásobné roztoky a skladujú sa v tme a chlade. Tieto roztoky sa sterilizujú filtráciou alebo autoklávovaním.

Médium sa pripraví pridaním správneho množstva zásobného roztoku do sterilnej destilovanej vody, pričom sa dbá na to, aby nedošlo k infekcii. V prípade tuhého média sa pridáva 0,8 % agaru.

Zásobná kultúra:

Zásobné kultúry sú malé kultúry rias, ktoré sa pravidelne prenášajú do čerstvého média, aby sa použili ako počiatočný testovací materiál. Ak sa kultúry nepoužívajú pravidelne, naočkujú sa do skúmaviek na šikmý agar. Potom sa aspoň raz za dva mesiace prenesú do čerstvého média.

Zásobné kultúry sa kultivujú v kónických bankách obsahujúcich vhodné médium (objem okolo 100 ml). Ak sa riasy inkubujú pri teplote 20 °C pri sústavnom osvetlení, je potrebný prenos raz týždenne.

Prenesie sa také množstvo „starej“ kultúry sterilnou pipetou do banky s čerstvým médiom, aby počiatočná koncentrácia rýchlo rastúceho druhu bola asi 100-násobne menšia ako v starej kultúre.

Rýchlosť rastu druhu sa môže stanoviť z rastovej krivky. Ak je táto rýchlosť známa, je možné určiť hustotu, pri ktorej by sa mala kultúra preniesť do nového média. To sa musí vykonať skôr, ako kultúra dosiahne stacionárnu fázu rastu.

Prípravná kultúra:

Prípravná kultúra je určená na to, aby poskytla potrebné množstvo rias na inokuláciu testovacích kultúr. Prípravná kultúra sa inkubuje pri testovacích podmienkach a použije sa, pokiaľ je ešte v exponenciálnom raste, spravidla po inkubačnom čase 2 až 4 dni. Kultúry rias obsahujúce deformované alebo abnormálne bunky sa musia odstrániť.

▼M6

Dodatok 5

Analýza údajov nelineárnou regresiou

Všeobecné aspekty

Reakcia v testoch na riasach a iných testoch mikrobiálneho rastu – rastu biomasy – je svojím charakterom kontinuálna alebo metrická premenná; ide o rýchlosť procesu, ak sa použije rýchlosť rastu, a jeho časový integrál, ak sa zvolí biomasa. Obidva sa vzťahujú na zodpovedajúcu strednú hodnotu reakcie paralelných neexponovaných kontrolných kultúr, ktoré vykazujú maximálnu reakciu za podmienok, ktorým sú vystavené, pričom svetlo a teplota sú v teste na riasach primárnymi určujúcim faktormi. Systém je distribuovaný alebo homogénny a na biomasu sa môže nahliadať ako na kontinuum, pričom sa nezohľadňujú jednotlivé bunky. Distribúcia rozptylu v prípade reakcie takéhoto systému sa vzťahuje iba na experimentálne faktory (spravidla opísané ako logaritmicko-normálne alebo normálne distribúcie chyby). To je opakom typických reakcií pri biologických testoch s kvantálnymi údajmi, pre ktoré sa tolerancia (typicky binomicky rozdelená) jednotlivých organizmov často pokladá za dominantnú zložku rozptylu. Reakcie kontrolných kultúr tu majú hodnotu nula alebo hodnotu pozadia.

V podmienkach bez výskytu komplikácií normalizovaná alebo relatívna reakcia r monotónne klesá z hodnoty 1 (nulová inhibícia) k hodnote 0 (100 % inhibícia). Treba si uvedomiť, že so všetkými reakciami sa spája chyba a že zjavné negatívne inhibície je možné vypočítať iba ako výsledok náhodnej chyby.

Regresná analýza

Modely

Regresná analýza sa zameriava na kvantitatívny opis krivky reakcie na koncentráciu vo forme matematickej regresnej funkcie $Y = f(C)$ alebo častejšie $F(Z)$, kde $Z = \log C$. Inverzné použitie $C = f^{-1}(Y)$ umožňuje výpočet hodnôt EC_x vrátane EC_{50}, EC_{10} a EC_{20} a ich 95 % hraníc spoľahlivosti. Niektoré jednoduché formy matematických funkcií sú schopné úspešne opísať vzťahy medzi koncentráciou a reakciou získané na základe testov inhibície rastu rias. Funkcie zahŕňajú napríklad logaritmickú rovnicu, nesymetrickú Weibullovu rovnicu a logaritmicko-normálnu funkciu distribúcie, z ktorých všetky tvoria sigmoidné krivky asymptoticky sa približujúce k nule pre $C \rightarrow 0$ a jednej pre $C \rightarrow$ nekonečno.

Použitie kontinuálnych modelov prahových funkcií (napr. Kooijmanov model „pre inhibíciu populačného rastu“, Kooijman a kol., 1996) je najnovším návrhom alebo alternatívou asymptotických modelov. Pri tomto modeli sa nepredpokladajú účinky pri koncentráciách pod určitou prahovou hodnotou, EC_0+, ktorá sa odhadne extrapoláciou vzťahu reakcie na koncentráciu, aby preťala os koncentrácie s použitím jednoduchej kontinuálnej funkcie, ktorá v počiatočnom bode nie je diferencovateľná.

Treba si uvedomiť, že analýza môže byť jednoduchou minimalizáciou súčtov reziduálnych štvorcov (za predpokladu konštantného rozptylu) alebo vážených štvorcov, ak je heterogenita rozptylu kompenzovaná.

Postup

Postup je možné opísať takto: zvolí sa príslušná rovnica funkcie $Y = f(C)$ a aproximuje sa na údaje nelineárnou regresiou. Je potrebné uprednostniť využitie meraní z každej jednotlivej banky pred využitím stredných hodnôt replikátov, aby sa z údajov získalo čo najviac informácií. Na druhej strane, z praktických skúseností vyplýva, že

▼M6

ak je rozptyl vysoký, stredné hodnoty replikátov môžu poskytnúť lepší matematický odhad, menej ovplyvnený systematickými chybami v údajoch, ako v prípade každého jednotlivého experimentálneho bodu.

Do diagramu sa zaznamená aproximovaná krivka a namerané údaje, pričom je potrebné skontrolovať, či je preloženie krivky správne. Obzvlášť užitočným nástrojom na tento účel môže byť analýza rezíduí. Ak zvolený funkčný vzťah použitý na reakciu na koncentráciu neopisuje dobre celú krivku alebo niektorú jej dôležitú časť, ako napríklad reakcie pri nízkych koncentráciách, je potrebné zvoliť inú možnosť aproximácie krivky – napríklad nesymetrickú krivku ako Weibullovu funkciu namiesto symetrickej krivky. Negatívne inhibície môžu byť problémom napríklad pre logaritmicko-normálnu funkciu distribúcie, ktorá si takisto vyžaduje alternatívnu regresnú funkciu. Neodporúča sa priradiť nulu ani malú kladnú hodnotu k takýmto záporným hodnotám, lebo to skresľuje distribúciu chýb. Môže byť vhodné vyhotoviť samostatné aproximácie krivky na častiach krivky, ako napríklad časť nízkej inhibície na odhad hodnôt $EC_{low\ x}$. Z použitej rovnice sa vypočítajú [„inverzným odhadom“, $C = f^{-1}(Y)$] charakteristické bodové odhady EC_x a zaznamenajú sa ako minimálne EC_{50} a jeden alebo dva odhady $EC_{low\ x}$. Zo skúseností z praktického testovania vyplýva, že presnosť testu na riasach spravidla umožňuje primerane presný odhad pri 10 % úrovni inhibície, ak je dostatok dátových bodov – pokiaľ sa nevyskytne stimulácia pri nízkych koncentráciách ako faktor spôsobujúci zmätok. Presnosť odhadu EC_{20} je často podstatne vyššia ako EC_{10}, keďže hodnota EC_{20} obvykle leží približne na lineárnej časti centrálnej krivky závislosti veličiny od koncentrácie. Niekedy môže byť ťažké interpretovať EC_{10} v dôsledku stimulácie rastu. Preto sa odporúča, aj keď je možné EC_{10} spravidla získať s dostatočnou presnosťou, zaznamenať vždy aj hodnotu EC_{20}.

Váhové faktory

Experimentálny rozptyl nie je spravidla konštantný a obvykle zahŕňa proporcionálnu zložku, preto je výhodné bežne vykonávať váženú regresiu. Váhové faktory pre takúto analýzu sa zvyčajne pokladajú za inverzne proporcionálne rozptylu:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Mnohé regresné programy povoľujú možnosť analýzy váženou regresiou s váženými faktormi uvedenými v tabuľke. Obvykle by sa mali vážené faktory normalizovať tak, že sa vynásobia hodnotou $n/\Sigma\ w_i$ (n je počet dátových bodov), aby sa ich súčet rovnal jednej.

Normalizované reakcie

Normalizovanie strednou hodnotou reakcie kontrolnej kultúry skrýva niektoré zásadné problémy a spôsobuje pomerne komplikovanú štruktúru rozptylu. Vydelením reakcií strednou hodnotou reakcie kontrolnej kultúry, aby sa získala percentuálna hodnota inhibície, dochádza k ďalšej chybe zapríčinenej chybou strednej hodnoty. Okrem prípadu, keď je táto chyba zanedbateľne malá, sa musia opraviť váhové faktory v regresii, ako aj hranice spoľahlivosti na kovarianciu s hodnotami pre kontrolnú kultúru (Draper a Smith, 1981). Treba si uvedomiť, že vysoká presnosť odhadovanej strednej hodnoty reakcie kontrolnej kultúry je dôležitá, aby sa minimalizovala celkový rozptyl pre relatívnu reakciu. Uvedený rozptyl je takýto:

(Index i sa vzťahuje na úroveň koncentrácie i a index 0 na kontrolné kultúry)

$$Yi = \text{relatívna reakcia} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

▼**M6**

s rozptylom $Var(Y_i) = Var\ (r_i/r_0) \cong (\partial Yi / \partial\ r_i)^2 \cdot Var(r_i) + (\partial\ Y_i/ \partial\ r_0)^2 \cdot Var(r_0)$

a keďže $(\partial\ Y_i/ \partial\ r_i) = 1/r_0$ a $(\partial\ Y_i/ \partial\ r_0) = r_i/r_0^2$

s normálne rozdelenými údajmi a replikátmi m_i a m_0: $Var(r_i) = \sigma^2/m_i$

celkový rozptyl relatívnej reakcie Yi je teda

$$Var(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

Chyba strednej hodnoty kontrolnej kultúry je inverzne proporcionálna k druhej odmocnine počtu spriemerovaných paralelných kontrolných kultúr, pričom niekedy môže byť opodstatnené zahrnúť predchádzajúce údaje, a tým vo veľkej miere znížiť chybu. Alternatívny postup je nenormalizovať údaje a aproximovať absolútne reakcie vrátane údajov o reakcii kontrolnej kultúry, ale zaviesť hodnoty reakcie kontrolnej kultúry ako ďalší parameter na použitie nelineárnou regresiou. Regresný výpočet má obvykle dva parametre, no táto metóda si vyžaduje tri parametre, a preto je potrebných viac dátových bodov ako pri nelineárnej regresii, pokiaľ ide o údaje, ktoré sú normalizované pri použití vopred nastavenej reakcie kontrolnej kultúry.

Intervaly inverznej spoľahlivosti

Výpočet intervalov spoľahlivosti nelineárnej regresie inverzným odhadom je pomerne zložitý a nie je dostupnou štandardnou voľbou v bežných počítačových štatistických programových balíkoch. Približné hranice spoľahlivosti sa môžu získať pomocou štandardných programov nelineárnej regresie s reparametrizáciou (Bruce a Versteeg, 1992), ktorá zahŕňa prepísanie matematickej rovnice požadovanými bodovými odhadmi, napríklad s EC_{10} a EC_{50} ako parametrami, ktoré sa majú odhadnúť. [Funkciou nech je I = f (α, β, koncentrácia) a použijú sa definičné vzťahy f (α, β, EC_{10}) = 0,1 a f (α, β, EC_{50}) = 0,5, aby sa nahradila f (α, β, koncentrácia) ekvivalentnou funkciou g (EC_{10}, EC_{50}, koncentrácia).

Priamejší výpočet (Andersen a kol., 1998) sa vykoná ponechaním pôvodnej rovnice a použitím Taylorovej expanzie okolo stredných hodnôt r_i a r_0.

V poslednom čase sa stala populárnou metóda „bootstrap“. Tieto metódy používajú namerané údaje a generátor náhodných čísel riadeného častého opätovného odberu vzoriek na odhad empirickej distribúcie rozptylu.

LITERATÚRA

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. **STANOVENIE „ĽAHKEJ“ BIODEGRADOVATEĽNOSTI**

ČASŤ I. **VŠEOBECNÉ ÚVAHY**

1.1. ÚVOD

Opísaných je šesť metód, ktoré umožňujú skríning látok a prípravkov na ľahkú biodegradovateľnosť v aeróbnom vodnom médiu:

a) Úbytok rozpusteného organického uhlíka (DOC) Die-Away (metóda C.4-A).

b) Modifikovaný skríningový test podľa OECD – DOC Die-Away (metóda C.4-B).

c) Vývoj oxidu uhličitého (CO_2) (modifikovaný Sturmov test) (metóda C.4-C).

d) Manometrická respirometria (metóda C.4-D).

e) Test uzavretej fľaše (metóda C.4-E).

f) MITI (Ministerstvo medzinárodného obchodu a priemyslu – Japonsko) (metóda C.4-F).

Všeobecné zamerania všetkých šiestich testov sú uvedené v časti I metódy. Položky, ktoré sú špecifické pre jednotlivé metódy, sú uvedené v častiach II až VII. Prílohy obsahujú pojmy, vzorce a návody.

Medzilaboratórny porovnávací test OECD, vykonaný v roku 1988, ukázal, že metódy poskytujú zhodné výsledky. V závislosti od fyzikálneho charakteru látky, ktorá má byť testovaná, sa však môže dávať prednosť určitej metóde.

1.2. VÝBER VHODNEJ SKÚŠOBNEJ METÓDY

Informácie o rozpustnosti látky alebo prípravku, tlaku pár a adsorpčných charakteristikách sú nevyhnutné pri výbere najvhodnejšej metódy. Mal by byť známy chemický vzorec alebo štruktúra, aby sa dali vypočítať a/alebo skontrolovať namerané hodnoty parametrov, napr. ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOC, COD (pozri prílohy I a II).

Testované chemické látky, ktoré sú rozpustné vo vode v koncentrácii aspoň 100 mg/l sa môžu hodnotiť všetkými metódami, pokiaľ nie sú prchavé a neadsorbujú sa. Pre látky alebo prípravky, ktoré sú slabo rozpustné vo vode, prchavé alebo sa adsorbujú, sú vhodné metódy uvedené v tabuľke č. 1. Spôsob, akým sa má zaobchádzať so slabo rozpustnými a prchavými látkami alebo prchavými prípravkami je opísaný v dodatku 3. Stredne prchavé látky alebo prchavé prípravky sa môžu testovať DOC Die-Away metódou, ak sa zabezpečí dostatok priestoru pre plynnú fázu v skúšobných nádobách (ktoré by mali byť vhodne uzavreté). V takomto prípade sa musí vykonať abiotická kontrola umožňujúca zistenie fyzikálnych strát.

▼B

Tabuľka 1

Aplikovateľnosť skúšobných metód

Test	Analytická metóda	Vhodnosť pre chemické látky, ktoré sú:		
		slabo rozpustné	prchavé	adsorbujúce
DOC. Die Away	rozpustený organický ublík	—	—	+/-
modifikovaný OECD Die-Away	rozpustený organický uhlík	—	—	+/-
vývoj CO_2	respirometria: uvoľňovanie CO_2	+	—	+
manometricka respirometria	manometrická respirometria: spotreba kyslíka	+	+/-	+
uzavretá fľaša	Respirometria: rozpustený kyslík	+/-	+	+
MITI	respirometria: spotreba kyslíka	+	+/-	+

Na interpretáciu získaných výsledkov sa požadujú informácie o čistote alebo relatívnom zastúpení jednotlivých zložiek testovaného materiálu, obzvlášť keď sú výsledky malé alebo na okraji detekcie.

Informácie týkajúce sa toxicity testovanej látky alebo prípravku pre baktérie (dodatok 4) môžu byť veľmi užitočné pri výbere vhodných testovaných koncentrácii a môžu byť nevyhnutné pre správnu interpretáciu nízkych hodnôt biodegradácie.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Na účely kontroly postupu sa testujú referenčné látky alebo prípravky, ktoré spĺňajú kritériá ľahkej biodegradovateľnosti, ich zaradením vo vhodnej banke paralelne k normálnemu testu.

Vhodnými látkami sú: anilín (čerstvo destilovaný), octan sodný, benzoan sodný. Tieto referenčné látky sa degradujú v týchto metódach, a to aj v prípade, ak sa úmyselne nepridalo inokulum.

Odporúča sa, aby za referenčnú látku bola vyhľadaná taká, ktorá je ľahko biodegradovateľná, ale vyžaduje prídavok inokula. Navrhnutý bol hydroftalát draselný, ale je potrebné získať viac informácií o tejto látke, skôr ako môže byť prijatá za referenčnú látku.

Pri respirometrických testoch môže byť ovplyvnená spotreba kyslíka látkami obsahujúcimi dusík procesom nitrifikácie (pozri prílohy II a V).

4. PRINCÍP SKÚŠOBNÝCH METÓD

Roztok alebo suspenzia testovanej látky v minerálnom médiu sa inokuluje a inkubuje v aeróbnych podmienkach v tme alebo za rozptýleného svetla. Množstvo DOC v testovanom roztoku by sa vzhľadom na inokulum malo udržiavať tak nízko, ako je to len možné v porovnaní s množstvom DOC vzhľadom na testovanú látku. Berie sa zreteľ na endogénnu aktivitu inokula tým, že sa vykonajú paralelne slepé testy s inokulom, ale bez testovanej látky, hoci endogénna aktivita buniek v prítomnosti látky nebude presne súhlasiť s endogénnou aktivitou v kontrole. Referenčná látka sa testuje paralelne, aby sa kontrolovala činnosť postupov.

▼B

Degradácia sa vo všeobecnosti sleduje stanovením parametrov, ako sú DOC, tvorba CO_2 a spotreba kyslíka, a merania sa vykonávajú v dostatočných časových intervaloch, aby to umožnilo identifikovať začiatok a koniec biodegradácie. Pri použití automatických respirometrov je meranie kontinuálne. Hodnota DOC sa niekedy meria navyše k inému parametru, ale zvyčajne sa to robí len na začiatku a na konci testu. Takisto sa môžu použiťšpecifické chemické analýzy na hodnotenie primárnej degradácie testovanej látky a stanovenie koncentrácie akéhokoľvek vzniknutého medziproduktu (povinné v MITI teste).

Test trvá za normálnych okolností 28 dní. Test sa však môže ukončiť pred uplynutím 28 dní, ak biodegradačná krivka dosiahla stacionárnu úroveň aspoň pri troch stanoveniach. Testy sa tiež môžu predĺžiť, ak z tvaru krivky vyplýva, že biodegradácia sa síce začala, ale ešte nedosiahla stacionárnu úroveň na 28. deň.

I.5. KRITÉRIÁ KVALITY

I.5.1. **Reprodukovateľnosť**

Stanovenia by sa mali vykonať aspoň v dvoch paralelkách, a to kvôli charakteru biodegradácie a zmesových bakteriálnych kultúr použitých ako inokulum.

Je všeobecnou skúsenosťou, že čím väčšia koncentrácia mikroorganizmov sa na začiatku pridá k skúšobnému médiu, tým menšie rozdiely sú medzi paralelkami. Kruhové testy ukázali, že môže dochádzať k veľkým rozdielom medzi výsledkami získanými v rôznych laboratóriách, ale normálne je dobrá zhoda v prípade ľahko biodegradovateľných látok.

I.5.2. **Platnosť testu**

Test sa považuje za platný, ak rozdiely extrémnych hodnôt paraleliek pri odstránení testovanej látky alebo prípravku na stacionárnej úrovni na konci testu alebo na konci 10-dňového okna sú menšie ako 20 % a ak percentuálna degradovateľnosť referenčnej látky dosiahla úroveň ľahkej biodegradovateľnosti do 14 dní. Ak sa jedna z týchto podmienok nedodrží, test by sa mal zopakovať. Vzhľadom na presnosť metód nízke hodnoty nemusia nutne znamenať, že testovaná látka nie je biodegradovateľná v environmentálnych podmienkach, ale indikovať, že je potrebné vykonať viac práce pri stanovení biodegradability.

Ak v teste toxicity, obsahujúcom testovanú látku a referenčnú látku alebo prípravok, dôjde k menej ako 35 % degradácii (na základe DOC) alebo menej ako 25 % (na základe ThOD alebo $ThCO_2$) počas 14 dní, testovaná látka alebo prípravok sa môže považovať za inhibujúce (pozri tiež prílohu IV). Testované série by sa mali zopakovať, ak možno použiť nižšie koncentrácie testovanej látky alebo prípravku a/alebo vyššie koncentrácie inokula, ale nie vyššie ako 30 mg tuhých látok/liter.

I.6. VŠEOBECNÉ POSTUPY A PRÍPRAVA

Všeobecné podmienky aplikované na testy sú sumarizované v tabuľke 2. Prístroje a ostatné experimentálne podmienky, špecificky prináležiace k jednotlivým testom, sú opísané neskôr pod hlavičkou pre daný test.

▼B

Tabuľka 2

Podmienky skúšania

Test	Test Die-Away	Vývoj CO_2	Manometrická respirometria	Modifikovaný skrínigový test OECD	Uzavretá fľaša	MITI (I)
Koncentrácia testovanej látky						
v mg/liter			100		2-10	100
mg DOC/liter	10 – 40	10 – 20		10 – 40		
mg TSP/liter			50 – 100		5 – 10	
Koncentrácia inokula (v bunkách/liter približne)	≤ 30 mg/liter SS alebo ≤ 100 ml eluátu na l (10^7 – 10^8)			0,5 ml sekundárneho eluátu na liter (10^5)	≤ 5 ml eluátu na liter (10^4 – 10^6)	30 mg na liter SS (10^7 – 10^8)
Koncentrácia prvkov v minerálnom médiu (mg/liter)						
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					podl'a možnosti 7,0
Teplota	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = rozpustený organický kyslík ThoD = teoretická potreba kyslíka SS = suspendované pevné látky

I.6.1. **Voda na prípravu roztokov**

Používa sa deionizovaná alebo destilovaná voda neobsahujúca inhibičné koncentrácie toxických látok (napr. ióny Cu^{++}). Musí obsahovať menej ako 10 % organického uhlíka, ktorý sa nachádza v testovanom materiáli. Vysoká čistota skúšobnej vody je nevyhnutná, aby sa eliminovali vysoké hodnoty slepého pokusu. Kontaminácia môže pochádzať z vnútorných nečistôt, iontomeniča a lyzovaných baktérií a rias. Pre každú sériu testov použite len úplne totožnú vodu z jednej sady, ktorá je skontrolovaná analýzou DOC. Takáto kontrola nie je nutná pri teste uzavretej fľaše, ale spotreba kyslíka vo vode musí byť nízka.

▼B

I.6.2. **Zásobné roztoky minerálnych zložiek**

Na prípravu skúšobných roztokov sa pripravia zásobné roztoky minerálnych zložiek vhodnej koncentrácie. Tieto zásobné roztoky sa môžu použiť (pri rozdielnych faktoroch zriedenia) pre metódy DOC Die-Away, modifikovaného skríningového testu OECD, vývoja CO_2, manometrickej respirácie, testu uzavretej fľaše.

Zrieďovacie faktory a špecifická príprava minerálneho média pre test MITI sú uvedené pod hlavičkou špecifických testov.

Zásobné roztoky

Pripravia sa tieto zásobné roztoky s použitím reagentov analytickej čistoty.

a) Dihydrogenfosforečňan draselný, KH_2PO_4 8,50 g

Hydrogénfosforečnan didraselný, K_2HPO_4 21,75 g

Hydrogénfosforečnan disodný dihydrát Na_2HPO_4. 2 H_20 33,40 g

Chlorid amónny, NH_4Cl 0,50 g

Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter. Hodnota pH roztoku musí byť 7,4.

b) Chlorid vápenatý bezvodý, $CaCl_2$ 27,50 g

alebo chlorid vápenatý dihydrát, $CaCl_2$, 2 H_20 36,40 g

Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter.

c) Síran horečnatý heptahydrát, $MgSO_4$. 7 H_2O 22,50 g

Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter.

d) Chlorid železitý hexahydrát, $FeCl_3$. $6H_2O$ 0,25 g

Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter.

Poznámka: Aby nebolo potrebné pripravovať tento roztok tesne pred jeho použitím, pridajte jednu kvapku koncentrovanej HC1 alebo 0,4 g EDTA na liter.

I.6.3. **Zásobné roztoky chemických látok a prípravkov**

Podľa vhodnosti napríklad rozpustite 1 až 10 g testovanej alebo referenčnej látky, alebo prípravku v deionizovanej vode a doplňte do 1 litra, ak rozpustnosť presahuje 1g/l. Inak pripravte zásobný roztok v minerálnom médiu alebo pridajte látku alebo prípravok priamo do minerálneho média. O zaobchádzaní s menej rozpustnými látkami alebo prípravkami pozri prílohu III, v teste MITI (metóda C.4-F) sa však nepoužívajú ani rozpúšťadlá, ani emulzifikátory.

▼B

I.6.4. **Inokulá**

Inokulum sa môže získať z rôznych zdrojov: napríklad z aktivovaného kalu, kanalizačného výtoku (bez chlóru), povrchových vôd, pôdy alebo ich zmesí. Ak sa používa aktivovaný kal pre testy DOC Die-Away, vývoj CO_2 a manometrická respirometria, odoberie sa z čističky alebo laboratórnej jednotky, ktoré spracúvajú najmä odpadové splaškové vody z domácností. Inokulá z iných zdrojov dávajú rozptýlenejšie výsledky. Zriedenejšie inokulum bez kalových vločiek je potrebné pre testy: modifikovaný skríningový OECD a test uzavretej fľaše, pričom uprednostňovaným zdrojom je sekundárny výtok z čističky odpadových vôd spracúvajúcej splaškové vody z domácností alebo laboratórna jednotka. Inokulum pre test MITI sa získava zo zmesi zdrojov a je opísané pod hlavičkou tohto špecifického testu.

I.6.4.1. *Inokulum z aktivovaných kalov*

Odoberie sa čerstvá vzorka aktivovaného kalu z prevzdušňovacieho tanku čističky odpadových vôd alebo laboratórnej jednotky, ktoré spracúvajú prevažne domáce splaškové vody. Odstránia sa hrubé častice, a ak je to nutné, použije sa jemné sitko a potom sa udržuje kal v aeróbnych podmienkach.

Alternatívne sa ponechá kal sedimentovať alebo sa odstredí (napr. 10 minút pri 1 100 g) po odstránení všetkých hrubých častíc. Odstráni sa supernatant. Kal sa môže premyť v minerálnom médiu. Suspenduje sa koncentrovaný kal v minerálnom médiu, aby sa získala koncentrácia tuhých častíc 3 až 5 g/l, a prevzdušňuje sa, pokiaľ je to potrebné.

Kal sa odoberie zo správne pracujúcej čističky. Ak sa musí kal odobrať z vysokostupňovej čističky alebo je možné, že obsahuje inhibitory, mal by sa premyť. Po dôkladnom premiešaní sa sedimentuje alebo odstredí resuspendovaný kal, odstráni sa supernatant a premytý kal znovu resuspenduje v ďalšom objeme minerálneho média. Tento postup sa opakuje, pokiaľ sa z kalu neodstráni nadbytok substrátu alebo inhibitor.

Z resuspendovaného alebo neošetreného kalu sa odoberie vzorka tesne pred použitím na stanovenie sušiny suspendovaných tuhých látok.

Ďalšou alternatívou je homogenizácia aktivovaného kalu (3 – 5 g suspendovaných tuhých látok/l). Kal sa prevzdušňuje v mechanickom mixéri 2 minúty pri strednej rýchlosti. Zmiešaný kal sa nechá sedimentovať 30 minút, alebo ak je to potrebné, aj dlhšie, a dekantuje sa kvapalinou na nižšie použitie ako inokulum v množstve 10 ml/l minerálneho média.

I.6.4.2. *Ostatné zdroje inokula*

Inokulum sa môže získať zo sekundárneho výtoku čističky alebo laboratórnej jednotky spracúvajúcej prevažne domáce splaškové vody. Odoberie sa čerstvá vzorka a počas prepravy sa udržuje prevzdušňovaním. Nechá sa sedimentovať asi 1 hodinu alebo sa prefiltruje cez hrubý filtračný papier a udržuje sa kvapalina po odstránení sedimentu alebo filtrát v aeróbnom stave, pokiaľ je to potrebné. Tento typ inokula sa môže použiť až do objemu 100 ml na 1 liter minerálneho média.

▼B

Ďalším zdrojom inokula je povrchová voda. V tomto prípade sa odoberie vzorka z vhodnej povrchovej vody, napr. rieky, jazera a udržiava sa v aeróbnom stave. Ak je to potrebné, koncentruje sa inokulum filtráciou alebo odstredením.

I.6.5. **Aklimatizácia inokula**

Inokulum sa môže aklimatizovať na experimentálne podmienky, ale nie pred adaptované k testovanej látke alebo prípravku. Aklimatizácia pozostáva z prevzdušňovania aktivovaného kalu v minerálnom médiu alebo v sekundárnom výtoku počas 5 až 7 dní pri teplote testovania. Aklimatizácia niekedy zlepšuje presnosť skúšobných metód tým, že znižuje hodnoty slepých pokusov. Za nevyhnutné sa to považuje v prípade aklimatizácie inokula v rámci testu MITI.

I.6.6. **Abiotické kontroly**

Skontroluje sa možnosť abiotickej degradácie testovanej látky stanovením odstránenia DOC, spotreby kyslíka alebo vývoja oxidu uhličitého v sterilných kontrolách neobsahujúcich inokulum. Sterilizuje sa filtráciou cez membránu (0,2 až 0,45 mikrometra) alebo prídavkom vhodnej toxickej látky vo vhodnej koncentrácii. Ak sa použije membránová filtrácia, odoberie sa vzorka asepticky, aby sa udržala sterilita. Pokiaľ adsorpcia testovanej látky alebo prípravku to vopred nevylučuje, testy, ktoré merajú biodegradáciu ako odstránenie DOC, obzvlášť s inokulom z aktivovaného kalu, by mali zahŕňať abiotickú kontrolu, ktorá sa inokuluje a sterilizuje jedom.

I.6.7. **Počet baniek**

Počet baniek v typickom teste je uvedený pod hlavičkou každého testu.

Môžu sa použiť tieto typy baniek:

— Testovacia suspenzia: obsahujúca testovanú látku a inokulum.

— Inokulový slepý pokus: obsahujúci len inokulum.

— Kontrola postupu: obsahujúca referenčnú látku a inokulum.

— Abiotická sterilná kontrola: obsahujúca testovanú látku (pozri I.6.6).

— Kontrola adsorpcie: obsahujúca testovanú látku, inokulum a sterilizujúcu látku.

— Kontrola toxicity: obsahujúca testovanú látku, referenčnú látku a inokulum.

Stanovenie v skúšobnej suspenzii a inokulovom slepom pokuse sa vykoná paralelne. Odporúča sa tiež vykonať stanovenia aj v iných bankách paralelne.

Toto sa však nemôže vždy uskutočniť. Je potrebné zaistiť, aby sa odobrali dostatočné vzorky alebo vykonalo vhodné odčítanie, umožňujúce, aby sa zhodnotilo percentuálne odstránenie v 10-dňovom okne.

▼B

I.7. ÚDAJE A VYHODNOTENIE

Pri výpočte D_t, percentuálnej degradácie, sa použijú stredné hodnoty paralelných meraní parametrov v testovaných nádobách a v inokulovom slepom pokuse. Vzorce sú uvedené v častiach o špecifických testoch. Priebeh degradácie sa zobrazí graficky a vyznačí sa 10-dňové okno. Vypočíta sa a uvedie percentuálne odstránenie, ktoré sa dosiahlo na konci 10-dňového okna, a hodnota stacionárnej úrovne alebo na konci testu, podľa toho, čo je vhodné.

V respirometrických testoch látky obsahujúce dusík môžu ovplyvniť spotrebu kyslíka kvôli prebiehajúcej nitrifikácii (pozri prílohy II a V).

I.7.1. **Degradácia meraná pomocou stanovenia DOC**

Percentuálna degradácia D_t v každom čase, keď bola odobraná vzorka, by sa mala vypočítať oddelene pre banky obsahujúce testovanú látku použitím strednej hodnoty meraní DOC, aby sa mohla posúdiť platnosť testu (pozri I.5.2). To sa vypočíta na základe tejto rovnice:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

kde:

D_t = % degradácie v čase t;

C_o = stredná počiatočná koncentrácia DOC v inokulovanom kultivačnom médiu obsahujúcom testovanú látku (mg DOC/l);

C_t = stredná koncentrácia DOC v inokulovanom kultivačnom médiu obsahujúcom testovanú látku v čase t (mg DOC/l);

C_{bo} = stredná počiatočná koncentrácia DOC v slepom pokuse inokulovaného minerálneho média (mg DOC/l);

C_{bt} = stredná koncentrácia DOC v slepom pokuse inokulovaného minerálneho média v čase t (mg DOC/l).

Všetky koncentrácie sú namerané experimentálne.

I.7.2. **Degradácia meraná s použitím špeciálnych analýz**

Keď sú dostupné špecifické analytické údaje, primárna biodegradácia sa vypočíta z tejto z rovnice:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

kde:

D_t = percentuálna degradácia v čase t, normálne po 28 dňoch;

S_a = zvyškové množstvo testovanej látky v inokulovanom médiu na konci testu (mg);

S_b = zvyškové množstvo testovanej látky v slepom pokuse s vodou/médiom, ku ktorému sa pridala len testovaná látka (mg).

▼B

I.7.3. **Abiotická degradácia**

Ak sa použije abiotická sterilná kontrola, vypočíta sa percento abiotickej degradácie s použitím tejto rovnice:

$$\text{abiotickádegradácia v\%} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

kde:

$C_{S(o)}$ = koncentrácia DOC v sterilnej kontrole, deň 0;

$C_{S(t)}$ = koncentrácia DOC v sterilnej kontrole, deň t.

I.8. SPRÁVA

Správa z testu by mala mať, ak je to možné, tieto informácie:

— testované a referenčné chemické látky a ich čistotu,

— podmienky skúšania,

— inokulum: povahu a miesto odobrania, koncentráciu a jeho predprípravu,

— pomer a povahu priemyselného odpadu prítomného v splaškových vodách, ak známa,

— dobu trvania testu a jeho teplotu,

— v prípade slabo rozpustných testovaných látok alebo prípravkov ich úpravu,

— aplikovanú testovaciu metódu, mali by byť uvedené vedecké dôvody a vysvetlenia pri akejkoľvek zmene postupu,

— súbor údajov,

— pozorované javy inhibície,

— každú pozorovanú abiotickú degradáciu,

— špecifické chemické analytické údaje, ak sú dostupné,

— analytické údaje o medziproduktoch, ak sú dostupné,

— graf závislosti percentuálnej degradácie oproti času pre testovanú a referenčnú látku, lag fázu, degradačnú fázu, 10-dňové okno a sklon by mali byť jasne uvedené (dodatok 1). Ak bol test v súlade s kritériami kvality, tak sa stredné hodnoty percentuálnej degradácie v bankách obsahujúcich testovanú látku môžu použiť na tvorbu grafu,

— percentuálne vyjadrenie odstránenia po 10-dňovom okne a v stacionárnej fáze alebo na konci testu.

ČASŤ II. **ÚBYTOK ROZPUSTENÉHO ORGANICKÉHO UHLÍKA (DOC DIE-AWAY)** (Metóda C.4-A)

II.1. PRINCÍP METÓDY

Známy objem inokulovaného minerálneho média so známou koncentráciou testovanej látky (10 až 40 mg DOC/1) ako nominálny jediný zdroj organického uhlíka sa prevzdušňuje za tmy alebo pri difúznom svetle pri teplote 22 ± 2 °C.

▼B

Degradácia sa sleduje pomocou analýzy DOC v častých intervaloch počas 28 dní. Stupeň biodegradácie sa vypočíta vyjadrením koncentrácie odstráneného DOC (upravené na kontrolu bez inokula) ako percento počiatočnej koncentrácie. Stupeň primárnej biodegradácie sa môže tiež vypočítať z dodatočnej analýzy na začiatku a na konci inkubácie.

II.2. OPIS METÓDY

II.2.1. **Prístroje**

a) Kónické banky, napr. 250 ml až 2 litre, v závislosti od potrebného objemu pre analýzu DOC.

b) Trepačka prispôsobená na kónické banky, a to s automatickým temperovaním teploty, alebo umiestnená v miestnosti so stabilnou teplotou a s dostatočným výkonom, aby zabezpečila aeróbne podmienky vo všetkých bankách.

c) Filtračné zariadenie s vhodnými membránami.

d) Analyzátor DOC.

e) Prístroj na stanovenie rozpusteného kyslíka.

f) Odstredivka.

II.2.2. **Príprava minerálneho média**

O príprave zásobných roztokov pozri I.6.2.

Zmieša sa 10 ml roztoku a) s 800 ml vody, pridá po 1 ml roztokov b) až d) a doplní do 1 litra vodou.

II.2.3. **Príprava a prekondiciovanie inokula**

Inokulum sa môže získať z rôznych zdrojov: aktivovaný kal, kanalizačný výtok, povrchové vody, pôda alebo ich zmesi.

Pozri: I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

II.2.4. **Príprava baniek**

Ako príklad sa do dvojlitrových kónických baniek s obsahom 800 ml minerálneho média pridajú vhodné objemy zásobných roztokov testovanej a referenčnej látky do oddelených baniek, aby sa získala koncentrácia ekvivalentná 10 až 40 mg DOC/l. Skontroluje sa pH hodnoty, a ak je to potrebné, upraví sa na hodnotu 7,4. Inokulujú sa banky s aktivovaným kalom alebo iným zdrojom inokula (pozri bod I.6.4), aby sa získala koncentrácia suspendovaných tuhých častíc menšia ako 30 mg/l. Pripravia sa tiež inokulové kontroly v minerálnom médiu, ale bez testovanej látky alebo referenčnej chemickej látky.

Ak je to potrebné, použite jednu nádobu na skontrolovanie možného inhibičného účinku testovanej látky alebo prípravku inokulovaním roztoku obsahujúceho v minerálnom médiu porovnateľné koncentrácie testovanej aj referenčnej chemickej látky.

Ak je to potrebné, použite tiež ďalšiu sterilnú banku, aby sa skontrolovalo, či sa testovaná látka alebo prípravok degraduje abioticky s použitím neinokulovaného roztoku chemickej látky (pozri I.6.6).

▼B

Okrem toho, ak existuje podozrenie, že sa testovaná látka alebo prípravok značne adsorbuje na sklo, kal atď., vykoná sa predbežné hodnotenie, aby sa stanovil pravdepodobný rozsah adsorpcie a tak aj vhodnosť testu pre látku alebo prípravok (pozri tabuľku 1). Pripraví sa banka obsahujúca testovanú látku, inokulum a sterilizačné činidlo.

Doplnia sa objemy vo všetkých bankách na 1 liter s minerálnym médiom a po premiešaní sa odoberie vzorka z každej banky na stanovenie počiatočnej koncentrácie DOC (pozri prílohu II.4). Otvory baniek sa prikryjú napr. hliníkovou fóliou takým spôsobom, aby sa umožnila voľná výmena vzduchu medzi bankou a okolitou atmosférou. Potom sa vložia nádoby do trepačky a vykoná sa test.

II.2.5. **Počet baniek v typickom teste**

Banky 1 a 2: Testovaná suspenzia.

Banky 3 a 4: Inokulový slepý pokus.

Banka 5: Kontrola postupu.

Odporúča sa, a ak je to potrebné:

Banka 6: Abiotická sterilná kontrola.

Banka 7: Kontrola na adsorpciu.

Banka 8: Kontrola toxicity.

Pozri tiež I.6.7.

II.2.6. **Realizácia testu**

Počas celého testu sa meria koncentrácia DOC v každej banke, v paralelkách, v známych časových intervaloch, dostatočne často, aby bolo možné stanoviť začiatok 10-dňového okna a percento odstránenia na konci 10-dňového okna. Odoberie sa len minimálny objem testovanej suspenzie, nevyhnutný na každé stanovenie.

Pred odberom vzorky sa doplnia straty vyparovaním z banky pridaním vody (I.6.1) v potrebnom množstve, ak je to nutné. Dôkladne sa premieša kultivačné médium pred odberom vzorky a zaistí sa, aby sa materiál, ktorý je prilepený k stenám nádob, rozpustil alebo suspendoval pred odobratím vzoriek. Po odobratí vzoriek sa ihneď filtrujú cez membránu alebo sa odstredia (pozri prílohu II.4). Filtrované alebo odstredené vzorky sa analyzujú v ten istý deň alebo sa skladujú pri teplote 2 – 4 ^{o}C maximálne 48 hodín alebo pod –18 ^{o}C dlhší čas.

II.3. ÚDAJE A SPRÁVA

II.3.1. **Spracovanie výsledkov**

Percento degradácie v čase t sa vypočíta tak, ako je uvedené v I.7.1 (stanovenie DOC) a prípadne podľa I.7.2 (špecifická analýza).

Všetky výsledky sa zaznamenajú na poskytnutý záznamník údajov.

▼B

II.3.2. **Platnosť výsledkov**

Pozri I.5.2.

II.3.3. **Správa**

Pozri I.8.

II.4. KARTA ÚDAJOV

Príklad karty údajov je uvedený nižšie.

TEST DOC DIE-AWAY

1. **LABORATÓRIUM**

2. **DÁTUM ZAČIATKU TESTU**

3. **TESTOVANÁ LÁTKA**

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: ...mg/l chemickej látky.

Počiatočná koncentrácia v médiu: ...mg/l chemickej látky.

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Vykonaná úprava:

Predkondiciovanie, ak sa vykonalo:

Koncentrácia suspendovaných tuhých látok v reakčnej zmesi: mg/l.

5. **STANOVENIE UHLÍKA**

Analyzátor uhlíka:

	Banka č.		DOC po n dňoch (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testovaná látka a inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, stredná hodnota $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, stredná hodnota $C_{b(t)}$					

▼B

	Banka č.		DOC po n dňoch (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Inokulový slepý pokus bez. testovanej chemickej látky	3	c_1					
		c_2					
		c, stredná hodnota $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d. stredná hodnota $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VYHODNOTENIE ZÁKLADNÝCH ÚDAJOV**

Banka č.		Degradáca v % po n dňoch				
		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				
Stredná hodnota (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Z hodnôt D_1 a D_2 by sa nemal robiť priemer, ak je medzi nimi výrazný rozdiel.

Poznámka: Podobné tabuľky sa môžu použiť pre referenčnú látku alebo prípravok a kontroly toxicity.

7. **ABIOTICKA KONTROLA (NEPOVINNÁ)**

	Čas (dni)	
	0	t
Koncentrácia DOC (mg/l) v sterilnej kontrole	$C_{a(l)}$	$C_{a(t)}$

$$\text{abiotický rozklad v\%} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ŠPECIÁLNA CHEMICKÁ ANALÝZA (NEPOVINNÁ)**

	Zvyškové množstvo testovanej chemichej látky na konci testu (mg/l)	Primárna degradácia v %
Sterilná kontrola	S_b	

▼B

	Zvyškové množstvo testovanej chemickej látky na konci testu (mg/l)	Primárna degradácia v %
Inokulované skúšobné médium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ČASŤ III. **MODIFIKOVANÝ SKRÍNINGOVÝ TEST OECD** (METÓDA C.4-B)

III.1. PRINCÍP METÓDY

Odmeraný objem minerálneho média, obsahujúci známu koncentráciu testovanej látky (10 až 40 mg DOC/1), ako nominálny jediný zdroj organického uhlíka sa inokuluje s 0,5 ml odtoku z čistiarne odpadových vôd na liter média. Zmes sa prevzdušňuje v tme alebo pri difúznom osvetlení pri teplote 22 ± 2 °C.

Degradácia sa sleduje pomocou analýzy DOC v častých intervaloch počas 28 dní. Stupeň biodegradácie sa vypočíta vyjadrením koncentrácie odstráneného DOC (upravené na kontrolu bez inokula) ako percento počiatočnej koncentrácie. Stupeň primárnej biodegradácie sa môže tiež vypočítať z dodatočnej analýzy na začiatku a na konci inkubácie.

III.2. OPIS METÓDY

III.2.1. **Prístroje**

a) Kónické banky, napr. 250 ml až 2 litre, v závislosti od potrebného objemu pre analýzu DOC.

b) Trepačka prispôsobená na kónické banky, a to s automatickým temperovaním teploty alebo umiestnená v miestnosti so stabilnou teplotou a s dostatočným výkonom, aby zabezpečila aeróbne podmienky vo všetkých bankách.

c) Filtračné zariadenie s vhodnými membránami.

d) Analyzátor DOC.

e) Prístroj na stanovenie rozpusteného kyslíka.

f) Odstredivka.

III.2.2. **Príprava minerálneho média**

O príprave zásobných roztokov pozri I.6.2.

Zmieša sa 10 ml roztoku a) s 80 ml vody, pridá po 1 ml roztokov b) až d) a doplní sa do 1 litra vodou.

Táto metóda používa len 0,5 ml inokula na liter, a preto môže vzniknúť potreba fortifikácie média stopovými prvkami a rastovými faktormi. To sa dosiahne pridaním 1 ml z týchto roztokov na liter konečného média:

▼B

Roztok stopových prvkov:

Síran mangánatý tetrahydrát, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
Kyselina boritá, H_3BO_3	57,2 mg
Síran zinočnatý heptahydrát, $ZnSO_4 . 7H_2O$	42,8 mg
Heptamolybdenan hexaamónny, $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Chelát Fe ($FeCl_3$ s kyselinou etyléndiamíntetraoctovou)	100,0 mg

Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.

Vitamínový roztok:

Kvasničný extrakt	15,0 mg

Kvasničný extrakt rozpustite v 100 ml vody. Sterilizujte filtráciou cez 0,2-mikrónovú (μm) membránu alebo pripravte čerstvý roztok.

III.2.3. **Príprava a prekondiciovanie inokula**

Inokulum sa môže získať zo sekundárneho výtoku čističky alebo laboratórnej jednotky, ktoré spracúvajú prevažne domáce splaškové vody. Pozri I.6.4.2 a I.6.5.

Použije sa 0,5 ml na liter minerálneho média.

III.2.4. **Príprava baniek**

Ako príklad pridajte 800 ml minerálneho média do 2-litrových kónických baniek a pridajte vhodné objemy zásobných roztokov testovanej a referenčnej látky do oddelených baniek, aby sa získala koncentrácia ekvivalentná 10 až 40 mg DOC/liter. Skontrolujte pH hodnoty, a ak je to potrebné, upravte ich na 7,4. Inokulujte banky s kanalizačným výtokom 0,5 ml/liter (pozri I.6.4.2). Tiež pripravte inokulové kontroly v minerálnom médiu, ale bez testovanej alebo referenčnej látky.

Ak je to potrebné, použite jednu nádobu na skontrolovanie možného inhibičného účinku testovanej látky alebo prípravku inokulovaním roztoku obsahujúceho v minerálnom médiu porovnateľné koncentrácie testovanej aj referenčnej chemickej látky.

Ak je to potrebné, použite tiež ďalšiu sterilnú banku, aby sa skontrolovalo, či sa testovaná látka alebo prípravok degraduje abioticky s použitím neinokulovaného roztoku chemickej látky (pozri I.6.6).

Okrem toho, ak existuje podozrenie, že sa testovaná látka alebo prípravok značne adsorbuje na sklo, kal atď., vykoná sa predbežné hodnotenie, aby sa stanovil pravdepodobný rozsah adsorpcie a tak aj vhodnosť testu pre látku alebo prípravok (pozri tabuľku 1). Pripraví sa banka obsahujúca testovanú látku, inokulum a sterilizačné činidlo.

Doplnia sa objemy vo všetkých bankách na 1 liter s minerálnym médiom a po premiešaní sa odoberie vzorka z každej banky na stanovenie počiatočnej koncentrácie DOC (pozri prílohu II.4). Otvory baniek sa prikryjú napr. hliníkovou fóliou takým spôsobom, aby sa umožnila voľná výmena vzduchu medzi bankou a okolitou atmosférou. Potom sa vložia nádoby do trepačky a vykoná sa test.

▼B

III.2.5. **Počet baniek v typickom teste**

Banky 1 a 2: Testovaná suspenzia.

Banky 3 a 4: Inokulový slepý pokus.

Banka 5: Kontrola postupu.

A odporúča sa, a ak je to potrebné:

Banka 6: Abiotická sterilná kontrola.

Banka 7: Kontrola na adsorpciu.

Banka 8: Kontrola toxicity.

Pozri tiež I.6.7.

III.2.6. **Realizácia testu**

Počas celého testu sa meria koncentrácia DOC v každej banke, v paralelkách, v známych časových intervaloch, dostatočne často, aby bolo možné stanoviť začiatok 10-dňového okna a percento odstránenia na konci 10-dňového okna. Odoberie sa len minimálny objem testovanej suspenzie, nevyhnutný na každé stanovenie.

Pred odberom vzorky sa doplnia straty vyparovaním z banky pridaním vody (I.6.1) v potrebnom množstve, ak je to nutné. Dôkladne sa premieša kultivačné médium pred odberom vzorky a zaistí sa, aby sa materiál, ktorý je prilepený k stenám nádob, rozpustil alebo suspendoval pred odobratím vzoriek. Po odobratí vzoriek sa ihneď filtrujú cez membránu alebo sa odstredia (pozri prílohu II.4). Filtrované alebo odstredené vzorky sa analyzujú v ten istý deň alebo sa skladujú pri teplote 2 – 4 °C maximálne 48 hodín alebo pod –18 °C dlhší čas.

III.3. ÚDAJE A SPRÁVA

III.3.1. **Spracovanie výsledkov**

Percento degradácie v čase t sa vypočíta tak, ako je uvedené v I.7.1 (stanovenie DOC) a prípadne podľa I.7.2 (špecifická analýza).

Všetky výsledky sa zaznamenajú na poskytnutý záznamník údajov.

III.3.2. **Platnosť výsledkov**

Pozri I.5.2.

III.3.3. **Správa**

Pozri I.8.

III.4. KARTA ÚDAJOV

Príklad karty údajov je uvedený nižšie.

MODIFIKOVANÝ SKRÍNINGOVÝ TEST OECD

1. **LABORATÓRIUM**

2. **DÁTUM ZAČIATKU TESTU**

▼B

3. **TESTOVANÁ LÁTKA**

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: ...mg/l chemickej látky.

Počiatočná koncentrácia v médiu: ...mg/l chemickej látky

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Vykonaná úprava:

Predkondiciovanie, ak sa vykonalo:

Koncentrácia suspendovaných tuhých látok v reakčnej zmesi: mg/l.

5. STANOVENIE UHLÍKA

Analyzátor uhlíka:

	Banka č.		DOC po n dňoch (mg/l[1])				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testovaná látka a inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, stredná hodnota $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, stredná hodnota $C_{b(t)}$					
Inokulový slepý pokus bez. testovanej chemickej látky	3	c_1					
		c_2					
		c, stredná hodnota $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d. stredná hodnota $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VYHODNOTENIE ZÁKLADNÝCH ÚDAJOV**

Banka č.		Degradácia v % po n dňoch				
		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

Banka č.		Degradácia v % po n dňoch				
		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				
Stredná hodnota ([1])	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

([1]) Z hodnôt D_1 a D_2 by sa nemal robiť priemer, ak je medzi nimi výrazný rozdiel.

Poznámka: Podobné tabuľky sa môžu použiť pre referenčnú látku alebo prípravok a kontroly toxicity.

7. **ABIOTICKÁ KONTROLA (NEPOVINNÁ)**

	Čas (dni)	
	0	t
Koncentrácia DOC (mg/l) v sterilnej kontrole	$C_{a(i)}$	$C_{a(t)}$

$$\text{abiotický rozklad v\%} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ŠPECIÁLNA CHEMICKÁ ANALÝZA (NEPOVINNÁ)**

	Zvyškové množsatvo testovanej chemickej látky na konci testu (mg/l)	Prímárna degradácia v %
Sterilná kontrola	S_b	
Inokulované skúšobné médium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ČASŤ IV. VÝVOJ OXIDU UHLIČITÉHO (CO_2) (METÓDA C.4-C)

IV.1. PRINCÍP METÓDY

Odmeraný objem inokulovaného minerálneho média, obsahujúceho známu koncentráciu testovanej látky alebo prípravku (10 až 20 mg DOC alebo TOC/l) ako nominálneho jediného zdroja organického uhlíka sa prevzdušňuje prechodom vzduchu neobsahujúceho CO_2 v kontrolovaných podmienkach za tmy alebo pri difúznom osvetlení. Degradácia sa meria počas 28 dní stanovovaním uvoľňovaného CO_2, ktorý sa zachytáva v hydroxide bárnatom alebo hydroxide sodnom a ktorý sa meria titráciou zvyškového hydroxidu alebo ako anorganický uhlík. Množstvo produkovaného CO_2 z testovanej látky alebo prípravku (upravené na hodnotu slepého inokulového pokusu) sa vyjadrí ako percento $ThCO_2$. Stupeň biodegradácie sa môže tiež vypočítať z dodatočnej analýzy DOC vykonanej na začiatku a na konci inkubácie.

▼B

IV.2. OPIS METÓDY

IV.2.1. **Prístroje**

a) 2-až 5-litrové banky, vybavené s aeračnou trubicou, dosahujúcou takmer na dno nádoby a výstupnou trubicou;

b) magnetické miešadlá, keď sa hodnotia slabo rozpustné látky alebo prípravky;

c) fľaše na absorbovanie plynu;

d) zariadenie na kontrolu a meranie prietoku vzduchu;

e) prístroj na odstránenie CO_2 pri príprave vzduchu, ktorý neobsahuje CO_2; prípadne sa môže použiť zmes kyslíka neobsahujúceho CO_2 a dusíka neobsahujúceho CO_2 z plynových fliaš v správnom pomere (20 % O_2 : 80 % N_2);

f) zariadenie na stanovenie CO_2, a to buď titráciou, alebo nejakým analyzátorom anorganického uhlíka;

g) zariadenie na membránovú filtráciu (nepovinné);

h) analyzátor DOC (nepovinné).

IV.2.2. **Príprava minerálneho média**

O príprave zásobných roztokov pozri I.6.2.

Zmiešajte 10 ml roztoku a) s 800 ml vody, pridajte po 1 ml roztokov b) až d) a doplňte vodou do 1 litra.

IV.2.3. **Príprava a prekondiciovanie inokula**

Inokulum sa môže získať z rôznych zdrojov: aktivovaný kal, kanalizačný výtok, povrchové vody, pôda alebo ich zmesi.

Pozri I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

IV.2.4. **Príprava baniek**

Ako príklad sa uvádzajú nasledujúce objemy a hmotnosti pre 5-litrové banky obsahujúce 3 litre suspenzie. Ak sa použijú menšie objemy, tieto hodnoty je potrebné podľa nich upraviť, ale je potrebné zaistiť, aby bolo možné presne merať vytváraný oxid uhličitý.

Do každej 5-litrovej banky pridajte 2 400 ml minerálneho média. Pridajte vhodný objem pripraveného aktivovaného kalu (pozri I.6.4.1 a I.6.5) tak, aby získaná koncentrácia suspendovaných tuhých častíc nepresiahla 30 mg/l v konečnej 3-litrovej inokulovanej zmesi. Alternatívne najskôr zrieďte pripravený kal v minerálnom médiu na suspenziu s koncentráciou 500 až 1 000 mg/l pred pridaním daného objemu do 5-litrovej banky tak, aby sa získala koncentrácia 30 mg/l; to zaistí väčšiu presnosť. Môžu použiť aj iné zdroje inokula (pozri I.6.4.2).

Cez noc prevzdušňujte tieto inokulované zmesi so vzduchom, ktorý neobsahuje CO_2, aby sa odstránil CO_2 zo systému.

▼B

Oddelene pridajte testovaný materiál a referenčnú látku v známom objeme zásobných roztokov, použite paralelky v koncentráciách za prídavku látky alebo prípravku 10 až 20 mg DOC alebo TOC/l, nechajte niektoré banky bez prídavku látky alebo prípravku ako inokulové kontroly. Slabo rozpustné testované látky pridajte priamo do baniek v takom množstve alebo objeme, ako je uvedené v dodatku 3.

Ak je to potrebné, použite jednu banku na kontrolu inhibičného účinku testovanej látky alebo prípravku pridaním testovanej aj referenčnej látky alebo prípravku v tej istej koncentrácii, aká je v ostatných bankách.

Takisto, ak je to potrebné, použite ďalšiu sterilnú banku na kontrolu, či sa testovaná látka alebo prípravok degraduje abioticky s použitím neinokulovaného roztoku látky alebo prípravku (pozri I.6.6). Sterilizujte prídavkom jedovatej látky vo vhodnej koncentrácii.

Doplňte objemy suspenzií vo všetkých bankách na 3 litre pridaním minerálneho média, ktoré sa predtým prevzdušnilo vzduchom neobsahujúcim CO_2. Prípadne sa môžu odobrať vzorky na analýzu DOC (pozri prílohu II.4) a/alebo na špecifickú analýzu. Pripojte absorpčné fľaše na výstupy z baniek.

Ak sa použije hydroxid bárnatý, sériovo spojte tri absorpčné fľaše, každú obsahujúcu 100 ml 0,0125 M roztoku hydroxidu bárnatého ku každej 5-litrovej banke. Roztoky nesmú obsahovať zrazeniny síranov a uhličitanov a ich sila sa musí stanoviť tesne pred použitím. Ak sa použije hydroxid sodný, pripojte dve fľaše, z ktorých druhá bude určená na demonštráciu, že sa všetok CO_2 absorboval v prvej fľaši. Absorpčné fľaše, na ktoré sedia uzávery sérových fliaš, sú bežne dostupné. Pridajte 200 ml 0,05 M NaOH do každej fľaše, čo stačí na absorbovanie všetkého CO_2, ktorý sa môže vyvinúť pri úplnej degradácii testovanej látky. Roztok NaOH, aj keď je čerstvo pripravený, bude obsahovať stopy uhličitanov; to sa koriguje stanovením uhličitanu v slepom pokuse.

IV.2.5. **Počet baniek v typickom teste**

Banky 1 a 2: Testovaná suspenzia,.

Banky 3 a 4: Inokulový slepý pokus.

Banka 5: Kontrola postupu.

A odporúča sa, a ak je to potrebné:

Banka 6: Abiotická sterilná kontrola.

Banka 7: Kontrola toxicity.

Pozri tiež I.6.7.

IV.2.6. **Realizácia testu**

Začnite test prebublávaním vzduchu bez CO_2 cez suspenziu pri prietoku 30 až 100 ml/min. Periodicky odoberajte vzorky absorbenta CO_2 na analýzu obsahu CO_2. Odporúča sa počas prvých desiatich dní vykonávať analýzy každý druhý alebo tretí deň a potom každý piaty deň až do 28. dňa, takže sa obdobie 10-dňového okna môže identifikovať.

▼B

Na 28. deň odoberte vzorky (voliteľné) na stanovenie DOC a/alebo špecifickú analýzu, merajte pH suspenzie a pridajte 1 ml koncentrovanej HCl do každej banky, prevzdušnite banky cez noc, aby sa odstránil CO_2 prítomný v testovaných suspenziách. Na 29. deň vykonajte posledné analýzy uvoľneného CO_2.

V dňoch merania CO_2 odpojte najbližšiu fľašu s $Ba(OH)_2$ k banke a titrujte roztok hydroxidu s 0,05 M HCl s použitím fenolftaleínu ako indikátora. Posuňte zostávajúce fľaše bližšie k banke a pripojte novú fľašu s absorbentom obsahujúcu 100 ml čerstvého roztoku 0,0125 M $Ba(OH)_2$ na koniec série fliaš. Vykonajte titrácie, ak sú potrebné, napr. keď sú zrazeniny viditeľné v prvej fľaši, ale predtým ako sú viditeľné v druhej fľaši alebo aspoň raz za týždeň. Ďalšou možnosťou je použitie NaOH ako absorbenta, v tomto prípade (v závislosti od charakteristiky použitého analyzátora uhlíka) odoberte striekačkou malú vzorku roztoku NaOH z absorpčnej fľaše bližšej k banke. Injektujte vzorku do časti IC analyzátora uhlíka na priamu analýzu uvoľneného CO_2.

Analyzujte obsah druhej záchytnej fľaše len na konci testu, aby sa korigovala hodnota na prípadne prenesený CO_2.

IV.3. ÚDAJE A SPRÁVA

IV.3.1. **Spracovanie výsledkov**

Množstvo zachyteného CO_2 v absorbente sa pri titrácii určuje podľa rovnice:

$$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

kde:

V = objem HCl použitý na titráciu 100 ml absorbenta (ml);

C_B = koncentrácia roztoku $Ba(OH)_2$ (M);

C_A = koncentrácia roztoku HCl (M);

ak je C_B0,0125 M a C_A je 0,05 M, titrácia 100 ml $Ba(OH)_2$ je 50 ml a hmotnosť CO_2 je daná podľa rovnice:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml HCl titrované} = 1{,}1 \times \text{ml HCl}$$

Preto sa v takomto prípade konvertuje objem titrovanej HCl na vytvorený CO_2 v mg faktorom 1,1.

Vypočítajte hmotnosti vytvoreného CO_2 samotným inokulom a inokulom v prítomnosti testovanej látky alebo prípravku s použitím príslušných hodnôt titrácií, potom rozdiel je hmotnosť vytvoreného CO_2 zo samotnej testovanej látky alebo prípravku.

Napríklad ak samotné inokulum má spotrebu na titráciu 48 ml a inokulum v prítomnosti testovanej látky má spotrebu 45 ml,

$$CO_2 \text{ z inokula} = 1{,}1 \times (50 - 48) = 2{,}2 \text{ mg}$$

▼B

CO_2 z inokula v prítomnosti testovanej látky = 1,1 × (50 – 45) = 5,5 mg,

a preto hmotnosť vytvoreného CO_2 z testovanej látky alebo prípravku je 3,3 mg.

Percento biodegradácie sa vypočíta z rovnice:

$$\%\text{degradácie} = \frac{\text{mg vytvoreného } CO_2 \times 100}{ThCO_2 \times \text{mg pridanej testovanej látky alebo prípravku}},$$

alebo

$$\%\text{degradácie} = \frac{\text{mg vytvoreného } CO_2 \times 100}{\text{mg pridaného TOC vteste} \times 3{,}67}$$

kde 3,67 je konverzný faktor (44/12) pre uhlík na oxid uhličitý.

Získajte percentuálnu degradáciu po každom časovom intervale pridaním percenta z vypočítaných hodnôt $ThCO_2$ pre každý deň až do času, keď sa merala.

Pre absorbent NaOH vypočítajte množstvo uvoľneného CO_2, vyjadrené ako IC (mg), vynásobením koncentrácie IC v absorbente objemom absorbentu.

Percento degradácie sa vypočíta podľa rovnice:

$$\%\ ThCO_2 = \frac{\text{mg IC ztestovanej banky} - \text{mg IC zo slepého pokusu}}{\text{mg TOC pridané ako testovaná látka alebo prípravok}} \times 100$$

Odstránenie DOC (nepovinné) sa vypočíta podľa I.7. Zaznamenajte tieto a ostatné výsledky do uvedenej karty údajov.

IV.3.2. **Platnosť výsledkov**

Obsah IC v suspenzii testovanej látky alebo prípravku v minerálnom médiu na začiatku testu musí byť menší ako 5 % TC a celková tvorba CO_2 v inokulovom slepom pokuse na konci testu by nemala normálne presahovať 40 mg/l média. Ak sú hodnoty väčšie ako 70 mg CO_2/liter, potom by sa mali kriticky posúdiť údaje aj experimentálna technika.

Pozri tiež I.5.2.

IV.3.3. **Správa**

Pozri I.8.

IV.4. KARTA ÚDAJOV

Príklad záznamníka údajov je uvedený nižšie.

TEST VÝVOJA OXIDU UHLIČITÉHO

1. **LABORATÓRIUM**

2. **DÁTUM ZAČIATKU TESTU**

3. **TESTOVANÁ LÁTKA ALEBO PRÍPRAVOK**

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: …mg/liter chemickej látky

▼B

Počiatočná koncentrácia v médiu: …mg/liter chemickej látky

Celkový C pridaný do banky: …mg C,

$ThCO_2$: mg CO_2

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Úprava:

Prekondiciovanie, ak sa vykonalo:

Koncentrácia suspendovaných tuhých látok v reakčnej zmesi: mg/liter.

5. TVORBA OXIDU UHLIČITÉHO A DEGRADOVATEĽNOSŤ

Metóda: $Ba(OH)_{2/NaOH/iné}$

Čas (dni)	CO_2 vytvorený v teste (mg)		CO_2 veidošanās no tukša parauga (mg)		Celkové množstvo CO_2 (priemer v teste mínus priemer v teste naslepo) (mg)		% $THCO_2$ celkový $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	priemer	3 / 4	priemer	1	2	1	2	priemer
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Poznámka: podobné tabuľky sa môžu použiť pre referenčné chemické látky a na kontrolu toxicity.

6. **ANALÝZA UHLÍKA (NEPOVINNÁ)**

Analyzátor uhlíka:

Čas (dni)	Test naslepo (mg/l)	Testovaná látka (mg/l)
0	$C_{b(l)}$	C_0
28 ([1])	$C_{b(t)}$	C_t

([1]) alebo na konci kultivácie.

▼B

$$\% \text{ odstráneného DOC} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_t - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ABIOTICKÁ DEGRADÁCIA (NEPOVINNÉ)**

$$\% \text{ abiotickejdegradácie} = \frac{CO_2 - \text{ tvorba CO2 vsterílnej banke po 28 dňoch (mg)}}{ThCO_2(mg)} \times 100$$

ČASŤ V. **TEST MANOMETRICKEJ RESPIROMETRIE** (METÓDA C.4-D)

V.1. PRINCÍP METÓDY

Známy objem inokulovaného minerálneho média, obsahujúci známu koncentráciu testovanej látky alebo prípravku (100 mg/liter testovanej látky, aby sa dosiahla koncentrácia aspoň 50 až 100 mg ThOD/liter) ako jediného nominálneho zdroja organického uhlíka, sa mieša v uzavretej banke pri konštantnej teplote (± 1 °C alebo presnejšie) počas 28 dní. Spotreba kyslíka sa stanoví meraním množstva kyslíka (produkovaného elektrolyticky), ktoré vyžaduje udržiavanie konštantného objemu plynu v respirometrickej banke, alebo zo zmien v objeme alebo tlaku (alebo ich kombinácia) v prístroji. Vyvinutý oxid uhličitý sa absorbuje v roztoku KOH alebo iného vhodného absorbenta. Množstvo kyslíka odobraného testovanou látkou alebo prípravkom (upravené na spotrebu inokulového slepého pokusu, ktorý prebieha paralelne) sa vyjadrí ako percento z ThOD alebo CHSK. Primárna biodegradácia sa môže prípadne tiež vypočítať z dodatočnej špecifickej analýzy vykonanej na začiatku a na konci inkubácie a z úplnej biodegradácie na základe analýzy DOC.

V.2. OPIS METÓDY

V.2.1. **Prístroje**

a) vhodný respirometer;

b) prístroj na udržiavanie a kontrolu teploty (± 1 °C alebo presnejšie);

c) zostava pre membránovú filtráciu (nepovinné);

d) analyzátor uhlíka (nepovinné).

V.2.2. **Príprava minerálneho média**

O príprave zásobných roztokov pozri I.6.2.

Zmiešajte 10 ml roztoku a) s 800 ml vody, pridajte po 1 ml roztokov b) až d) a doplňte vodou do 1 litra.

V.2.3. **Príprava a prekondiciovanie inokula**

Inokulum sa môže získať z rôznych zdrojov: aktivovaného kalu, kanalizačného výtoku, povrchových vôd, pôdy alebo ich zmesí.

Pozri I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

V.2.4. **Príprava baniek**

S použitím zásobných roztokov pripravte v oddelených sadách 100 mg roztoky testovanej látky alebo prípravku a referenčnej látky/liter (ktoré poskytujú aspoň 50 až 100 mg ThOD/liter).

▼B

Vypočítajte ThOD na základe tvorby amónnych solí, pokiaľ nedochádza k nitrifikácii, keď by výpočet mal byť založený na tvorbe dusičnanov (pozri prílohu II.2).

Stanovte hodnoty pH, a ak je to potrebné, upravte ich na 7,4 ± 0,2.

Slabo rozpustné látky alebo prípravky by sa mali pridať neskôr (pozri nižšie).

Ak sa má stanoviť toxicita testovanej látky alebo prípravku, pripravte roztok v minerálnom médiu, ktorý obsahuje súčasne testovanú látku alebo prípravok aj referenčnú látku v tých istých koncentráciách ako v jednotlivých roztokoch.

Ak sa vyžaduje meranie fyzikálno-chemickej spotreby kyslíka, pripravte roztok testovanej látky alebo prípravku, normálne 100 mg ThOD/liter, ktorý bol sterilizovaný prídavkom vhodnej toxickej látky (pozri I.6.6).

Umiestnite pripravené objemy roztokov testovanej a referenčnej látky alebo prípravku aspoň do dvoch paralelných baniek. Do ďalších baniek pridajte len minerálne médium (na inokulové kontroly), a ak sa to vyžaduje, zmes roztoku testovanej a referenčnej látky alebo prípravku a sterilného roztoku.

Ak je testovaná chemická látka slabo rozpustná, pridajte ju priamo na hmotnostnom alebo objemovom základe alebo postupujte podľa prílohy III. Pridajte KOH pelety alebo iný absorbent do častí určených na absorbciu CO_2.

V.2.5. **Počet baniek v typickom teste**

Banky 1 a 2: Testovaná suspenzia

Banky 3 a 4: Inokulový slepý pokus

Banka 5: Kontrola postupu

A odporúča sa, ak je to potrebné:

Banka 6: Sterilná kontrola

Banka 7: Kontrola toxicity

Pozri tiež I.6.7.

V.2.6. **Realizácia testu**

Zohrejte nádoby na požadovanú teplotu a inokulujte ich s pripraveným aktivovaným kalom alebo iným zdrojom inokula tak, aby koncentrácia suspendovaných tuhých častíc nepresiahla 30 mg/liter. Zložte zariadenie, zapnite miešadlo, skontrolujte vzduchotesnosť a začnite meranie spotreby kyslíka. Zvyčajne nie je potrebná iná starostlivosť, ako získať potrebné údaje a vykonať dennú kontrolu správnosti teploty a miešania.

Vypočítajte spotrebu kyslíka z údajov, ktoré sa zistili v pravidelných a častých intervaloch, podľa metód uvedených výrobcom zariadenia. Na konci inkubácie, normálne po 28 dňoch, odmerajte pH obsahu baniek, najmä ak spotreba kyslíka bola nízka alebo väčšia ako $ThODNH_4$ (pre chemické látky obsahujúce dusík).

▼B

Ak je to potrebné, odoberte vzorky z respirometrických baniek na začiatku a na konci na analýzu DOC alebo špecifickej látky alebo prípravku (pozri prílohu II.4). Pri počiatočnom odbere zaistite, aby zostávajúci objem testovanej suspenzie v banke bol známy. Ak sa kyslík spotrebúva testovanou látkou obsahujúcou dusík, stanovte nárast koncentrácie dusitanov a dusičnanov počas 28 dní a vypočítajte korekciu na kyslík spotrebovaný nitrifikáciou (dodatok 5).

V.3. ÚDAJE A SPRÁVA

V.3.1. **Spracovanie výsledkov**

Vydeľte spotrebu kyslíka (mg) testovanou látkou alebo prípravkom po danom čase (upravené na spotrebu kyslíka kontrolným inokulovým slepým pokusom po rovnakom čase) hmotnosťou použitej testovanej látky alebo prípravku. Tak sa získa BSK, vyjadrená ako mg kyslíka/mg testovanej látky alebo prípravku, t. j.:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg spotreby } O_2 \text{ testovanej látky} - \text{mg spotreby } O_2 \text{ slepého pokusu})}{(\text{mg testovanej látky alebo prípravku v banke})}$$

= mg O_2 na mg testovanej látky alebo prípravku

Vypočítajte percento biodegradácie buď z rovnice:

$$\%\ \text{biodegradácie} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg BSK}(\text{mg O2 látky alebo prípravku}))}{\text{ThOD}(\text{mg ThOD}(\text{mg O2 látky alebo prípravku}))} \times 100$$

alebo z rovnice

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg BSK}(\text{mg O2 látky alebo prípravku}))}{\text{ThOD}(\text{mg ThOD}(\text{mg O2 látky alebo prípravku}))} \times 100$$

Je potrebné poznamenať, že tieto dve metódy nemusia nutne poskytovať rovnakú hodnotu, uprednostňuje sa použitie prvej metódy.

Pre testované látky alebo prípravky obsahujúce dusík použite vhodné ThOD (NH_4 alebo NO_3) podľa toho, čo je známe alebo sa očakáva o výskyte nitrifikácie (pozri prílohu II.2). Ak dôjde k výskytu nitrifikácie, ale nie úplnej, vypočítajte úpravu na kyslík spotrebovaný nitrifikáciou zo zmien v koncentrácii dusitanov a dusičnanov (dodatok 5).

Ak sú vykonané voliteľné stanovenia organického uhlíka a/alebo špecifickej látky alebo prípravku, vypočítajte percento degradácie podľa I.7 tejto metodiky.

Zaznamenajte všetky výsledky na pripojený záznamník údajov.

V.3.2. **Platnosť výsledkov**

Spotreba kyslíka v inokulovom slepom pokuse je normálne 20 až 30 mg O_2 na liter a nemala by presahovať 60 mg/liter za 28 dní. Hodnoty vyššie ako 60 mg/liter vyžadujú kritické prehodnotenie údajov a experimentálnych techník. Ak pH hodnota je mimo rozsahu 6 až 8,5 a spotreba kyslíka testovanou látkou alebo prípravkom je menšia ako 60 %, potom by sa mal test zopakovať s nižšou koncentráciou testovanej látky.

Pozri tiež I.5.2.

▼B

V.3.3. **Správa**

Pozri I.8.

V.4. **KARTA ÚDAJOV**

Príklad záznamníka údajov je uvedený ďalej.

TEST MANOMETRICKEJ RESPIROMETRIE

1. **LABORATÓRIUM**

2. **DÁTUM ZAČIATKU TESTU**

3. **TESTOVANÁ LÁTKA ALEBO PRÍPRAVOK**

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: … mg/liter

Počiatočná koncentrácia v médiu, C_o: … mg/liter

Objem v skúšobnej banke (V): … ml

ThOD alebo CHSK: mg O_2/mg testovanej látky (NH_4 alebo NO_3)

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Úprava:

Prekondiciovanie, ak sa vykonalo:

Koncentrácia suspendovaných tuhých látok v reakčnej zmesi: mg/liter.

5. **SPOTREBA KYSLÍKA: BIODEGRADOVATEĽNOSŤ**

		Čas (dni)											
		0		7		14			21			28	
Spotreba O_2 (mg) testovanou látkou	1												
	2												
	a, priemer												
Spotreba O_2 (mg) v teste naslepo	3												
	4												
	b, priemer												
Korigovaná BSK (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BSK na mg testovanej látky	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Čas (dni)											
		0		7		14			21			28	
Rozklad v % $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Priemer (*)												

V = objem média v skúšobnej banke.
(*) Nemal by sa urobiť priemer z hodnôt D_1 a D_2, ak je medzi nimi výrazný rozdiel.

Poznámka: Podobná tabuľka sa môže použiť pre referenčnú chemickú látku a na kontrolu toxicity.

6. **KOREKCIA NA NITRIFIKÁCIU (POZRI PRÍLOHU V).**

Deň		0	28	Rozdiel
i)	Koncentrácia dusičnanov (mg N na liter)			{N)
ii)	Kyslíkový ekvivalent (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
iii)	Koncentrácia dusitanov (mg N na liter)			{N)
iv)	Kyslíkový ekvivalent (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
ii + iv)	Celkový kyslíkový ekvivalent	—	—	

7. **ANALÝZA UHLÍKA (NEPOVINNÉ)**

Analyzátor uhlíka:

Čas (dni)	Test naslepo (mg/l)	Testovaná látka (mg/l)
D	(C_{blo})	(C_o)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)

(*) Alebo na konci inkubácie.

$$\%\ DOC\%\ odstráneného = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **ŠPECIFICKÁ CHEMICKÁ LÁTKA (NEPOVINNÉ)**

S_b = koncentrácia vo fyzikálno-chemickej (sterilnej) kontrole po 28 dňoch

S_a = koncentrácia v inokulovanej banke po 28 dňoch.

$$\%\ biodegradácie = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOTICKÁ DEGRADÁCIA (NEPOVINNÉ)**

a = spotreba kyslíka (O_2) v sterilných bankách po 28 dňoch (mg)

$$spotreba\ kyslíka\ na\ mg\ testovavej\ látky\ alebo\ prípravku = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(pozri oddiely 1 a 3)

$$\% \text{ abiotickejdegradácie} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

ČASŤ VI. **TEST UZAVRETEJ FĽAŠE** (METÓDA C.4-E)

VI.1. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Roztok testovanej látky alebo prípravku v minerálnom médiu, 2 až 5 mg/liter, sa inokuluje s relatívne malým počtom mikroorganizmov zo zmesovej populácie a udržiava sa v úplne plných, uzavretých fľašiach v tme za konštantnej teploty. Degradácia sa sleduje analýzou rozpusteného kyslíka počas 28-dňového obdobia. Množstvo spotrebovaného kyslíka testovanou látkou alebo prípravkom, upravené na spotrebu inokulového slepého pokusu, ktorý sa testuje paralelne, sa vyjadrí ako percento ThOD alebo CHSK.

VI.2. OPIS METÓDY

VI.2.1. **Prístroje**

a) fľaše BSK so sklenenými uzávermi, napr. 250 až 300 ml;

b) vodný kúpeľ alebo inkubátor na udržiavanie fliaš pri konštantnej teplote (± 1 °C alebo presnejšie) s vylúčením svetla;

c) veľké sklenené fľaše (2-až 5-litrové) na prípravu média na naplnenie fliaš BSK;

d) kyslíková elektróda a prístroj alebo zariadenie a reagenty na Winklerovu titráciu.

VI.2.2. **Príprava minerálneho média**

O príprave zásobných roztokov pozri I.6.2.

Zmiešajte 1 (jeden) ml roztokov (a) až (d) a doplňte vodou do 1 litra.

VI.2.3. **Príprava inokula**

Inokulum sa normálne získa zo sekundárneho výtoku čističky alebo laboratórnej jednotky, ktoré prevažne spracúvajú domáce splaškové vody. Alternatívnym zdrojom inokula je povrchová voda. Používa sa jedna kvapka (0,05 ml) až 5 ml filtrátu na liter média, môžu byť potrebné pokusy na zistenie optimálneho objemu pre daný výtok (pozri I.6.4.2 a I.6.5).

VI.2.4. **Príprava baniek**

Aspoň 20 minút intenzívne prevzdušňujte minerálne médium. Pripravte každú testovaciu sériu z minerálneho média z tej istej zásoby. Vo všeobecnosti je médium pripravené na použitie až po 20 hodinách státia pri teplote testovania. Stanovte koncentráciu rozpusteného kyslíka na účely kontroly, pri 20 °C by mala byť hodnota okolo 9 mg/liter. Vykonajte všetky prenosy a plnenia vzduchom nasýteného, bubliny neobsahujúceho média, napr. s použitím sifónu.

▼B

Pripravte paralelné skupiny BSK fliaš na stanovenie testovanej a referenčnej látky na simultánne experimentálne série. Zostavte dostatočný počet BSK fliaš vrátane inokulového slepého pokusu, tak aby bolo možné meranie spotreby kyslíka aspoň v dvoch paralelkách v požadovaných skúšobných intervaloch, napr. po 0, 7, 14, 21 a 28 dňoch. Viac fliaš sa môže vyžadovať na zaistenie identifikácie 10-dňového okna.

Pridajte kompletne prevzdušnené minerálne médium do veľkých fliaš tak, aby boli naplnené asi do jednej tretiny. Potom pridajte vhodné množstvo zásobných roztokov testovanej látky alebo prípravku a referenčnej látky do osobitných veľkých fliaš tak, aby konečná koncentrácia látky alebo prípravku nepresahovala 10 mg/liter. Do ďalšej veľkej fľaše obsahujúcej kontrolný slepý pokus nepridávajte žiadne látky ani prípravky.

Aby sa zaistilo, že aktivita inokula nie je limitovaná, koncentrácia rozpusteného kyslíka nesmie byť v BSK fľašiach nižšia ako 0,5 mg/liter. To limituje koncentráciu testovanej látky alebo prípravku asi na 2 mg/liter. Avšak v prípade slabo degradovateľných látok alebo prípravkov a látok alebo prípravkov s nízkou hodnotou ThOD sa môže použiť koncentrácia 5 až 10 mg/liter. V niektorých prípadoch sa odporúča testovať paralelne pri dvoch rozdielnych koncentráciách, napríklad 2 mg/liter a 5 mg/liter. Normálnym spôsobom vypočítajte ThOD na základe tvorby amónnych solí, ale ak sa vie alebo očakáva, že bude prebiehať nitrifikácia, je potrebné vypočítať túto hodnotu na základe tvorby dusičnanov ($ThOD_{NO3}$: pozri prílohu II.2). Ak však nitrifikácia nie je úplná, ale predsa prebieha, je potrebné vykonať korekciu na zmeny v koncentrácii dusitanov a dusičnanov stanovených analýzou (pozri prílohu V).

Ak je potrebné testovať toxicitu testovanej látky alebo prípravku (v prípade napríklad zistenej nízkej biodegradovateľnosti), sú potrebné ďalšie série fliaš.

Pripravte ďalšiu veľkú fľašu obsahujúcu prevzdušnené minerálne médium (asi do jednej tretiny jej objemu) a testovanú látku alebo prípravok a referenčnú látku v rovnakých konečných koncentráciách, aké sú v ostatných veľkých fľašiach.

Inokulujte roztoky vo veľkých fľašiach so sekundárnym výtokom (jedna kvapka alebo asi 0,05 ml až 5 ml/liter) alebo iným zdrojom, ako je riečna voda (pozri I.6.4.2). Nakoniec doplňte roztoky na objem s prevzdušneným minerálnym médiom s použitím hadičky dosahujúcej až na dno fľaše, aby sa dosiahlo riadne premiešanie.

VI.2.5. **Počet baniek v typickom teste**

V typickom teste sa použijú tieto fľaše:

— aspoň 10 fliaš obsahujúcich testovanú látku alebo prípravok a inokulum (testovaná suspenzia),

— aspoň 10 fliaš obsahujúcich len inokulum (inokulový slepý pokus),

— aspoň 10 fliaš obsahujúcich referenčnú látku a inokulum (kontrola postupu),

▼B

— a ak je to nutné, 6 fliaš obsahujúcich testovanú látku alebo prípravok, referenčnú látku a inokulum (kontrola toxicity). Aby sa však zaistila identifikácia 10-dňového okna, bol by potrebný približne dvojnásobný počet fliaš.

VI.2.6. Realizácia testu

Ihneď rozdeľte každý pripravený roztok do príslušnej skupiny BSK fliaš s použitím hadičky zo spodnej štvrtiny (nie z dna) vhodne veľkej fľaše, tak aby všetky BSK fľaše boli úplne naplnené. Jemne trasením odstráňte všetky vzduchové bubliny. Okamžite analyzujte v nulovom čase rozpustený kyslík Winklerovou alebo elektródovou metódou. Obsah fliaš sa môže zakonzervovať pre neskoršiu analýzu Winklerovou metódou pridaním síranu manganatého (II) a hydroxidu sodného (prvý Winklerov reagent). Uskladnite starostlivo uzavreté fľaše obsahujúce zafixovaný kyslík ako hnedý hydratovaný (III) oxid manganitý v tme pri teplote 10 až 20 °C nie dlhšie ako 24 hodín pred vykonaním zostávajúcich krokov Winklerovej metódy. Uzavrite zostávajúce paralelné fľaše tak, aby sa zaistilo, že nie sú uzavreté žiadne vzduchové bubliny, a inkubujte za tmy pri teplote 20 °C. Každá séria musí byť spolu s kompletnou paralelnou sériou na stanovenie slepého pokusu inokulovaného média. Odoberte aspoň po dve fľaše zo všetkých sérií na analýzu rozpusteného kyslíka v časových intervaloch (aspoň týždenne) počas 28-dňovej inkubácie.

Týždenné odbery vzoriek umožnia hodnotenie percentuálneho odstránenia v 14-dňovom okne, avšak odbery každé 3 až 4 dni by mali umožniť identifikovať 10-dňové okno, čoby vyžadovalo dvojnásobok fliaš.

Pre testované látky obsahujúce dusík by sa mali vykonať korekcie na spotrebu kyslíka prípadnou nitrifikáciou. Aby sa toto vykonalo, použite metódu kyslíkovej elektródy na stanovenie koncentrácie rozpustného kyslíka a potom odoberte vzorku z BSK fľaše na analýzu dusitanov a dusičnanov. Z nárastu koncentrácie dusitanov a dusičnanov vypočítajte spotrebovaný kyslík (pozri prílohu V).

VI.3. ÚDAJE A SPRÁVA

VI.3.1. **Spracovanie výsledkov**

V prvom rade vypočítajte BSK získaný po každej časovej perióde odpočítaním spotreby kyslíka (mg O_2/liter) v inokulovom slepom pokuse od spotreby kyslíka testovanou látkou alebo prípravkom. Vydeľte túto upravenú spotrebu koncentráciou (mg/liter) testovanej látky alebo prípravku, aby sa získala špecifická hodnota BSK ako mg kyslíka na mg testovanej látky alebo prípravku. Vypočítajte percento biodegradovateľnosti vydelením špecifickej hodnoty BSK so špecifickou hodnotou ThOD (vypočítanou podľa prílohy II.2) alebo CHSK (stanovené analýzou, pozri prílohu II.3), potom:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg spotreby } O_2 \text{testovanej} - \text{mg spotreby } O_2 \text{slepého pokusu})}{(\text{BSK})}$$

▼B

= mg O_2 na mg testovanej látky alebu prípravku

$$\% \text{ degradácie} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg BSK } (\text{mg } O_2/\text{mg testovanej chemickej látky}))}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2/\text{mg ThOD } (\text{mg } O_2/\text{mg testovanej chemickej látky}))} \times 100$$

alebo

$$\% \text{ degradácie} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg BSK } (\text{mg } O_2/\text{mg testovanej chemickej látky}))}{\text{COD}(\text{mg } O_2/\text{mg CHSK } (\text{mg } O_2/\text{mg testovanej chemickej látky}))} \times 100$$

Je potrebné poznamenať, že tieto dve metódy nemusia nutne poskytovať rovnakú hodnotu, uprednostňuje sa použitie prvej metódy.

Pre testované látky obsahujúce dusík použite vhodné ThOD (NH_4 alebo NO_3) podľa toho, čo je známe alebo sa očakáva o výskyte nitrifikácie (pozri prílohu II.2). Ak dôjde k výskytu nitrifikácie, ale nie úplnej, vypočítajte úpravu na kyslík spotrebovaný nitrifikáciou zo zmien v koncentrácii dusitanov a dusičnanov (dodatok 5).

VI.3.2. **Platnosť výsledkov**

Spotreba kyslíka v inokulovom slepom pokuse by nemala presahovať 1,5 mg rozpusteného O_2/liter po 28 dňoch. Hodnoty vyššie ako táto vyžadujú prehodnotenie a posúdenie experimentálnych techník. Počas celého testu by sa nemala zvyšková koncentrácia kyslíka znížiť pod 0,5 mg/liter. Takéto nízke hladiny kyslíka sú platné, len ak metódy stanovenia rozpustného kyslíka sú schopné presne merať takéto nízke koncentrácie.

Pozri tiež I.5.2.

VI.3.3. **Správa**

Pozri I.8.

VI.4. KARTA ÚDAJOV

Príklad karty údajov je uvedený ďalej.

TEST UZAVRETEJ FĽAŠE

1. **LABORATÓRIUM**

2. **DÁTUM ZAČIATKU TESTU**

3. **TESTOVANÁ LÁTKA ALEBO PRÍPRAVOK**

   Názov:

   Koncentrácia zásobného roztoku: ... mg/liter

   Počiatočná koncentrácia vo fľaši: ... mg/liter

   ThOD alebo CHSK: ... mg O_2/mg testovanej látky

4. **INOKULUM**

   Zdroj:

   Úprava:

▼B

Prekondiciovanie, ak sa vykonalo:

Koncentrácia v reakčnej zmesi: … mg/liter

5. **STANOVENIE ROZPUSTENÉHO KYSLÍKA**

Metóda: Winklerova/elektródová

Analýzy baniek

Doba inkubácie (d)			Rozpustený kyslik (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Test naslepo (bez chemickej látky)	1	C_1				
	2	C_2				
Priemer	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Testovaná chemická látka	1	a_1				
	2	a_2				
Priemer	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Poznámka: Podobná tabuľka sa môže použiť pre referenčnú látku a na kontrolu toxicity

6. **KOREKCIA NA NITRIFIKÁCIU (POZRI PRÍLOHU V)**

Doba inkubácie d)		0	n_1	n_2	n_3
i)	Koncentrácia dusičnanov (mg N na liter)				
ii)	Zmena koncentrácie dusičnanov (mg N na liter)	—			
ii)	Kyslíkový ekvivalent (mg/l)	—			
iv)	Koncentrácia dusitanov (mg N na liter)				
v)	Zmena koncentrácie dusitanov (mg N na liter)	—			
vi)	Kyslíkový ekvivalent (mg/l)	—			
iii + vi)	Celkový kyslíkový ekvivalent (mg/l)	—			

7. **SPOTREBA ROZPUSTENÉHO KYSLÍKA: % DEGRADÁCIE**

	Spotreba po n dňoch (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
BANKA 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
BANKA 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Spotreba po n dňoch (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
BANKA 1: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{koncentrácia látky} \times \text{ThOD látky}}$				
BANKA 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{koncentrácia látky} \times \text{ThOD látky}}$				
$\%\ D\ \text{priemer}\ (*) = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) Nepočítajte priemer, ak je výrazný rozdiel medzi paralelkami.

m_{to} = hodnota v skúšobnej banke v čase 0

m_{tx} = hodnota v skúšobnej banke v čase x

m_{bo} = stredná hodnota slepého pokusu v čase 0

m_{bx} = stredná hodnota slepého pokusu v čase x

Tiež aplikujte korekciu na nitrifikáciu z iii + vi v oddiele 6.

8. **SPOTREBA ROZPUSTENÉHO KYSLÍKA V SLEPOM POKUSE**

Spotreba kyslíka v slepom pokuse: ($m_{bo} - m_{b28}$) mg/liter. Táto spotreba je dôležitá pre platnosť testu. Mala by byť menšia ako 1,5 mg/liter.

ČASŤ VII. **TEST M.I.T.I.** (METÓDA C.4-F)

VII.1. PRINCÍP METÓDY

Spotreba kyslíka v miešanom roztoku alebo suspenzii testovanej látky alebo prípravku v minerálnom médiu, inokulovanom so špeciálne kultivovanými, neadaptovanými mikroorganizmami sa meria automaticky počas 28 dní v tmavom, uzavretom respirometri pri teplote 25 ± 1 °C. Vyvíjaný oxid uhličitý sa absorbuje nátronovým vápnom. Biodegradovateľnosť je vyjadrená v percentách spotreby kyslíka (korigované na spotrebu slepého pokusu) z teoretickej spotreby (ThOD). Percento primárnej biodegradovateľnosti sa tiež vypočíta z dodatočnej špecifickej analýzy vykonanej na začiatku a na konci inkubácie a prípadne z analýzy DOC.

VII.2. OPIS METÓDY

VII.2.1. **Prístroje**

a) automatický elektrolytický BSK-meter alebo respirometer, normálne vybavený 6 fľašami s 300 ml objemu a nádobami obsahujúcimi absorbent CO_2;

▼B

b) miestnosť s konštantnou teplotou a/alebo vodný kúpeľ s teplotou 25 ± 1 °C alebo presnejšie;

c) zariadenie na membránovú filtráciu (nepovinné);

d) analyzátor uhlíka (nepovinné).

VII.2.2. **Príprava minerálneho média**

S použitím látok analytickej čistoty a vody pripravte tieto zásobné roztoky (I.6.1):

a)	Dihydrogénfosforečnan draselný, KH_2PO_4	8,50 g
	Hydrogénfosforečnan didraselný, K_2HPO_4	21,75 g
	Hydrogénfosforečnan dvoj sodný dodekahydrát Na_2HPO_4 12 H_2O	44,60 g
	Chlorid amónny, NH_4Cl	1,70 g
	Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter.	
	Hodnota pH roztoku musí byť 7,2.	
b)	Síran horečnatý heptahydrát, $MgSO_4$ 7 H_2O	22,50 g
	Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter.	
c)	Chlorid vápenatý bezvodý, $CaCl_2$	27,50 g
	Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter.	
d)	Chlorid železitý hexahydrát, $FeCl_3$ 6 H_2O	0,25 g
	Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter.	

Odoberte 3 ml z každého roztoku a), b), c) a d) doplňte do 1 litra.

VII.2.3. **Príprava inokula**

Získajte čerstvé vzorky z najmenej desiatich miest, najmä z oblasti, kde sú použité a rozptýlené rozličné látky alebo prípravky. Z miest, ako sú čističky odpadových vôd, čističky vôd priemyselného odpadu, rieky, jazerá, more zhromaždite 1 liter vzorky kalu, povrchovej pôdy, vody atď. a zmiešajte ich spolu. Po odstránení plávajúcich látok a odstátí upravte hodnotu pH supernatantu na pH 7 ± 1 s hydroxidom sodným (NaOH) alebo s kyselinou fosforečnou (H_3PO_4).

Použite vhodný objem filtrovaného supernatantu na naplnenie nádoby s aktivovaným kalom a prevzdušňujte kvapalinu asi 23,5 hodiny. Tridsať minút po zastavení prevzdušňovania oddeľte asi jednu tretinu objemu supernatantu a pridajte rovnaký objem roztoku (pH 7) obsahujúceho 0,1 % glukózy, peptonu a dihydrofosforečnanu draselného k usadenému materiálu a znovu začnite prevzdušňovanie. Opakujte tento postup raz denne. Kalová jednotka musí fungovať podľa správnej praxe: výtok by mal byť číry, teplota by sa mala udržiavať na 25 ± 2 °C, hodnota pH má byť 7 ± 1, kal by sa mal dobre sedimentovať, dostatočné prevzdušňovanie by malo udržiavať zmes stále aeróbnu, mali by byť prítomne prvoky a aktivita kalu by sa mala testovať referenčnou látkou aspoň každé tri mesiace. Nepoužite kal ako inokulum skôr ako po jednom mesiaci, ale už nie po štyroch mesiacoch. Preto odoberte vzorku aspoň z 10 miest v pravidelných intervaloch, raz za tri mesiace.

▼B

Aby sa udržala rovnaká aktivita čerstvého a starého kalu, zmiešajte filtrovaný supernatant aktivovaného kalu, ktorý sa používa s rovnakým objemom filtrovaného supernatantu z čerstvo zhromaždenej zmesi z 10 miest, a kultivujte kombinovanú zmes, ako je vyššie uvedené. Použite kal ako inokulum po 18 až 24 hodinách po pridaní živín.

VII.2.4. **Príprava baniek**

Pripravte týchto 6 baniek:

Banka č. 1: testovaná látka alebo prípravok vo vode, 100 mg/liter.

Banka č. 2, 3 a 4: testovaná látka alebo prípravok v minerálnom médiu, 100 mg/liter.

Banka č. 5: referenčná látka alebo prípravok (napr. anilín) v minerálnom médiu 100 mg/liter.

Banka č. 6: samotné minerálne médium.

Slabo rozpustné testované chemické látky pridajte priamo, a to podľa ich hmotnosti alebo objemu, alebo s nimi zaobchádzajte podľa toho, ako je to uvedené v dodatku 3, okrem toho by sa nemali pridať rozpúšťadlá ani emulzifikátory. Pridajte absorbent CO_2 do všetkých príslušných nádob. Upravte hodnotu pH v bankách č. 2, 3 a 4 na 7,0.

VII.2.5. **Realizácia. testu**

Inokulujte banky č. 2, 3 a 4 (testované suspenzie), č. 5 (kontrola aktivity) a č. 6 (inokulový slepý pokus) s malým objemom inokula tak, aby sa dosiahla koncentrácia suspendovaných tuhých častíc 30 mg/l. Žiadne inokulum sa nepridáva do banky č. 1, ktorá slúži ako abiotická hodnota. Zložte zariadenie, skontrolujte vzduchotesnosť, zapnite miešadlá a začnite meranie spotreby kyslíka bez prístupu svetla. Denne kontrolujte teplotu, miešadlá a coulometricky záznamník spotreby kyslíka a zaregistrujte akékoľvek zmeny farby obsahov baniek. Odčítajte spotrebu kyslíka pre šesť baniek priamo pomocou vhodnej metódy, napr. zo šesťbodového zapisovača, ktorá poskytuje krivku BSK. Na konci inkubácie, normálne po 28 dňoch, odmerajte hodnotu pH obsahu baniek a stanovte koncentráciu zvyškovej testovanej látky alebo prípravku a akéhokoľvek medziproduktu a v prípade vo vode rozpustných látok vo vode koncentráciu DOC (pozri prílohu II.4). Zvláštna pozornosť sa musí venovať prchavým chemickým látkam. Ak sa predpokladá nitrifikácia, stanovte koncentráciu dusičnanov a dusitanov, ak je to možné.

VII.3. ÚDAJE A SPRÁVA

VII.3.1. **Spracovanie výsledkov**

Vydeľte spotrebu kyslíka (mg) testovanou látkou alebo prípravkom, po danom čase upravené na spotrebu kyslíka kontrolným inokulovým slepým pokusom po rovnakom čase, hmotnosťou použitej testovanej látky alebo prípravku. Tak sa získa BSK vyjadrený ako mg kyslíka/mg testovanej chemickej látky, t. j.

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg spotreby } O_2 \text{testovanou látkou} - \text{mg spotreby } O_2 \text{slepého pokusu látkou}}{\text{mg testovanej látky alebo prípravku vbanke}}$$

= mg O_2 na mg testovanej látky alebo prípravku.

▼B

Percentuálna biodegradácia sa potom získa z:

$$\%\ \text{biodegradácie} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2\text{BSK (mg } O_2/\text{mg látky alebo prípravku}))}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2/\text{mg ThOD (mg } O_2\text{mg látky alebo prípravku}))} \times 100$$

Pre zmesi vypočítajte ThOD z elementárnej analýzy tak ako pre jednotlivé látky alebo prípravky. Použite vhodný ThOD ($ThOD_{NH4}$, $ThOD_{NO3}$) podľa toho, či nedochádza k nitrifikácii, alebo či nitrifikácia prebieha kompletne (pozri prílohu II.2). Ak však nitrifikácia prebieha, ale je neúplná, vykonajte korekciu na kyslík spotrebovaný nitrifikáciou zo zmien v koncentráciách dusitanov a dusičnanov (dodatok 5).

Vypočítajte percento primárnej biodegradácie zo straty špecifickej (parentálnej, pôvodnej) látky alebo prípravku (pozri I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\%$$

Ak došlo k strate testovanej látky alebo prípravku v banke č. 1, merajúcej fyzikálno-chemické odstránenie, uveďte to v správe a použite koncentráciu testovanej látky alebo prípravku (S_b) po 28 dňoch v tejto banke na výpočet percenta biodegradácie.

Ak sa vykonajú stanovenia DOC (nepovinné), vypočítajte percento konečnej biodegradácie z:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\%$$

ako je opísané pod bodom I.7.1. Ak došlo k strate DOC v banke č. 1, merajúcej fyzikálno-chemické odstránenie, použite koncentráciu DOC v tejto banke na výpočet percenta biodegradácie.

Zaznamenajte všetky výsledky na pripojený záznamník údajov.

VII.3.2. **Platnosť výsledkov**

Spotreba kyslíka v inokulovom slepom pokuse je normálne 20 až 30 mg O_2 na liter a nemala by presahovať 60 mg/liter za 28 dní. Hodnoty vyššie ako 60 mg/liter vyžadujú kritické prehodnotenie údajov a experimentálnych techník. Ak je pH hodnota mimo rozsahu 6 až 8,5 a spotreba kyslíka testovanou látkou alebo prípravkom je menšia ako 60 %, potom by sa mal test zopakovať s nižšou koncentráciou testovanej látky.

Pozri tiež I.5.2.

Ak percento degradácie anilínu, vypočítané zo spotreby kyslíka, nepresahuje 40 % po 7 dňoch a 65 % po 14 dňoch, test sa považuje za neplatný.

3.3. **Správa**

Pozri I.8.

VII.4. KARTA ÚDAJOV

Príklad karty údajov je uvedený nižšie.

TEST MITI (I)

1. **LABORATÓRIUM**

2. **DÁTUM ZAČIATKU TESTU**

▼B

3. **TESTOVANÁ LÁTKA**

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: ... mg/liter chemickej látky.

Počiatočná koncentrácia v médiu C_o: ... mg/liter chemickej látky.

Objem reakčnej zmesi, V: ... ml.

ThOD: ... mg O_2/liter.

4. **INOKULUM**

Miesta odberu vzoriek kalu:

1. …
2. …
3. …
4. …
5. …
6. …
7. …
8. …
9. …
10. …

Koncentrácia suspendovaných tuhých častíc v aktivovanom kale po aklimatizácii so syntetickým výtokom = … mg/liter.

Objem aktivovaného kalu na liter konečného média = … ml.

Koncentrácia kalu v konečnom médiu = … mg/liter

5. **SPOTREBA KYSLÍKA: BIODEGRADOVATEĽNOSŤ**

Typ použitého respirometra:

			Čas (dni)				
			0	7	14	21	28
Spotreba O_2 (mg) testovanou látkou	a_1						
	a_2						
	a_3						
Spotreba O_2 (mg) v teste naslepo	b						
Korigovaná spotreba O_2 (mg)	$(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$						
BSK na mg testovanej	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	Banka 1					
		Banka 2					
		Banka 3					
Rozklad v % $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		Priemer ([1])					

([1]) Nepočítajte priemer, ak je výrazný rozdiel medzi paralelkami.

▼B

Poznámka: Podobné tabuľky sa môžu použiť pre referenčnú látku.

6. **ANALÝZA UHLÍKA (NEPOVINNÉ)**

Analyzátor uhlíka:

Banka	DOC				% odstráneného DOC	Priemer
	Nameraná hodnota		Korigovaná hodnota			
Voda + testovaná látka	a				—	—
Kal + testovaná látka	b_1		$b_1 - c$			
Kal + testovaná látka	b_2		$b_2 - c$			
Kal + testovaná látka	b_3		$b_3 - c$			
Kontrolný test naslepo	c		—		—	—

$$\% \text{ odstráneného} = \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **ÚDAJE ZO ŠPECIFICKEJ CHEMICKEJ ANALÝZY**

	Zvyškové množstvo testovanej chemickej látky na koci testu	degradácia v %
Test naslepo s vodou	S_b	
Inokulované médium	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\%\text{degradácie} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Vypočítaje % degradácie pre banky a1, a2, a a3.

8. **POZNÁMKY**

Ak je to možné, mala by sa pripojiť krivka závislosti BSK od času.

▼B

DODATOK 1

SKRATKY A POJMY

DO: Rozpustený kyslík (mg/liter) je koncentrácia rozpusteného kyslíka vo vodnej vzorke.

BSK: Biochemická spotreba kyslíka (g) je množstvo spotrebovaného kyslíka mikroorganizmami počas metabolizovania testovanej látky alebo prípravku, tiež vyjadrené ako g spotrebovaného kyslíka na g testovanej chemickej látky (pozri metódu C.5).

CHSK: Chemická spotreba kyslíka (g) je množstvo spotrebovaného kyslíka počas oxidácie testovanej látky alebo prípravku v teplom, okyslenom dvojchrómane; umožňuje meranie množstva prítomnej oxidovateľnej látky; tiež vyjadruje spotrebovaný kyslík v g na g testovanej látky alebo prípravku (pozri metódu C.6).

DOC: Rozpustený organický uhlík je organický uhlík prítomný v roztoku alebo ten, ktorý prechádza cez 0,45-mikrometrový filter alebo ostáva v supernatante po odstredení pri 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g) počas 15 minút.

ThOD: Teoretická spotreba kyslíka (mg) je teoretické množstvo kyslíka, ktoré sa požaduje na kompletnú oxidáciu látky alebo prípravku; vypočíta sa z molekulového vzorca (pozri prílohu II.2) a je tiež vyjadrená v mg kyslíka potrebných na mg testovanej látky.

$ThCO_2$: Teoretický oxid uhličitý (mg) je vypočítané množstvo oxidu uhličitého, ktoré sa vytvorí zo známeho alebo odmeraného obsahu uhlíka v testovanej látke alebo prípravku, keď je kompletne mineralizovaná; je tiež vyjadrený v mg oxidu uhličitého uvoľneného z mg testovanej látky alebo prípravku.

TOC: Celkový organický uhlík vzorky je súhrn organického uhlíka v roztoku a v suspenzii.

IC: Anorganický uhlík.

TC: Celkový uhlík je súhrn organického a anorganického uhlíka prítomného vo vzorke.

Primárna biodegradácia:

je zmena v štruktúre látky, spôsobená biologickým účinkom, ktorá má za následok stratu špecifickej vlastnosti tejto látky.

Úplná biodegradácia (aeróbna):

je taká dosiahnutá úroveň degradácie, keď testovanú látku alebo prípravok úplne spotrebujú mikroorganizmy, čoho výsledkom je tvorba oxidu uhličitého, vody, minerálnych solí a nových mikrobiálnych bunkových zložiek (biomasy).

Ľahko biodegradovateľné:

je dohodnutá klasifikácia chemických látok, ktoré prešli cez určité špecifické skríningové testy na úplnú biodegradovateľnosť; tieto testy sú také prísne, že sa predpokladá, že takéto látky alebo prípravky sa budú rýchlo a úplne biodegradovať vo vodnom prostredí v aeróbnych podmienkach.

▼B

Inherentne (prirodzene) biodegradovateľné:

je klasifikácia chemických látok, pre ktoré existuje jednoznačný dôkaz ich biodegradácie (primárnej alebo úplnej) v každom uznanom teste na biodegradovateľnosť.

Odbúrateľnosť:

je poddajnosť látok, aby boli odbúrané počas biologického čistenia odpadovej vody bez škodlivého ovplyvnenia normálneho priebehu procesov čistenia. Všeobecne možno konštatovať, že ľahko biodegradovateľné látky sú odbúrateľné, ale to sa už nedá konštatovať o všetkých vnútorne biodegradovateľných látkach. Do odbúrania môžu byť zapojené aj abiotické procesy.

Fáza lag:

je čas od inokulácie, v teste Die-Away, po dosiahnutí aspoň 10 % degradácie. Fáza lag je často veľmi variabilná a slabo reprodukovateľná.

Doba trvania degradácie:

je čas od konca fázy lag až po čas, kým sa nedosiahne 90 % degradácia.

10-dňové okno:

je 10 dní nasledujúcich po dosiahnutí 10 % degradácie.

▼B

DODATOK 2

VÝPOČET A STANOVENIE VHODNÝCH SUMÁRNYCH PARAMETROV

Určité sumárne parametre sa budú vyžadovať v závislosti od zvolenej metódy. Nasledujúca časť opisuje odvodenie týchto hodnôt. Použitie týchto parametrov je opísané pri jednotlivých metódach.

1. **Obsah uhlíka**

Obsah uhlíka sa vypočíta zo známeho elementárneho zloženia alebo sa stanoví elementárnou analýzou testovanej látky.

2. **Teoretická spotreba kyslíka (ThOD)**

Teoretická spotreba kyslíka (ThOD) sa môže vypočítať, ak je známe elementárne zloženie alebo stanovené elementárnou analýzou. Je pre látku

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

bez nitrifikácie

$$ThOD_{NH4} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

alebo s nitrifikáciou,

$$ThOD_{NO3} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl) + 5/2n + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

3. **Chemická spotreba kyslíka (CHSK)**

Chemická spotreba kyslíka (CHSK) je stanovená podľa metódy C.6.

4. **Rozpustený organický uhlík (DOC)**

Rozpustený organický uhlík (DOC) je v súlade s pojmami organický uhlík každej látky alebo prípravku, alebo zmesi vo vode prechádzajúci cez 0,45-mikrometrový filter.

Vzorky z testovaných nádob sa odoberajú a filtrujú okamžite vo filtračnom prístroji s použitím vhodného membránového filtra. Prvých 20 ml (množstvo sa môže zredukovať, keď sa používajú malé filtre) sa odstráni. Objemy 10 až 20 ml alebo nižšie, ak sú injektované (objem závisí od požadovaného množstva pre analyzátor uhlíka), sa nechávajú na analýzu uhlíka. Koncentrácia DOC sa stanoví pomocou analyzátora organického uhlíka, ktorý je schopný presne merať koncentráciu uhlíka ekvivalentnú alebo nižšiu ako 10 % počiatočnej koncentrácie DOC použitej v teste.

Filtrované vzorky, ktoré sa nemôžu analyzovať v ten istý pracovný deň, sa môžu chrániť skladovaním v chladničke pri teplote 2 – 4 °C počas 48 hodín alebo pri teplote pod –18 °C počas dlhšieho obdobia.

Poznámky:

Membránové filtre sú často impregnované povrchovo aktívnymi látkami kvôli hydrofilizácii. Takto filter môže obsahovať až niekoľko mg rozpustného organického uhlíka, ktorý by interferoval so stanovením biodegradability. Surfaktanty a iné rozpustné organické látky alebo prípravky sa odstraňujú z filtrov varom v deionizovanej vode trikrát po jednej hodine. Filtre sa potom môžu skladovať vo vode jeden týždeň. Ak sa použijú jednorazové filtre, je vždy potrebné sa presvedčiť, či neuvoľňujú rozpustný organický uhlík.

▼B

V závislosti od typu membránového filtra sa môže testovaná látka alebo prípravok zachytávať adsorpciou. Preto môže byť vhodné uistiť sa, že sa testovaná látka alebo prípravok nezachytáva na filtri.

Odstreďovanie pri 40 000 $m.s^{-2}$ (4 000 g) počas 15 minút možno použiť na rozlíšenie TOC od DOC namiesto filtrácie. Metóda nie je vhodná pri počiatočnej koncentrácii menšej ako 10 mg DOC/liter, pretože nie sú odstránené všetky baktérie alebo uhlík ako súčasť bakteriálnej plazmy je znovu rozpustený.

LITERATÚRA

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, p. 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 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), 169.

▼B

DODATOK 3

VYHODNOCOVANIE BIODEGRADOVATEĽNOSTI SLABO ROZPUSTNÝCH LÁTOK

Pri testoch biodegradovateľnosti slabo rozpustných látok je potrebné venovať pozornosť týmto požiadavkám.

Kým homogénne kvapaliny budú len zriedkavo predstavovať problém pri odbere vzoriek, odporúča sa, aby tuhé materiály boli homogenizované vhodným spôsobom, aby sa tak zabránilo chybám spôsobeným nehomogénnosťou. Špeciálnu pozornosť treba venovať v prípade požiadaviek na reprezentatívne vzorky niekoľkých miligramov zo zmesí látok alebo prípravkov, alebo látok s veľkým množstvom nečistôt.

Počas testov sa môžu použiť rôzne spôsoby miešania. Pozornosť by sa mala venovať len dostatočnému miešaniu, aby sa látka alebo prípravok udržiavali dispergované a aby sa zabránilo prehrievaniu, nadmernému peneniu a prílišným mechanickým silám.

Môže sa použiť emulzifikátor, ktorý zabezpečuje stabilnú disperziu látky alebo prípravku. Nemal by byť toxický pre baktérie a nesmie byť biodegradovateľný alebo spôsobovať penenie v podmienkach testu.

Pre rozpúšťadlá platia rovnaké kritériá ako pre emulzifikátor.

Neodporúča sa použitie pevných nosičov pre tuhé testované látky, ale môžu byť vhodné pre olejovité látky.

Pri použití pomocných látok, ako emulzifikátorov, rozpúšťadiel a nosičov, by sa mal vykonať slepý pokus s pomocnou látkou.

Každý z troch respirometrických testov CO_2, BSK, MITI sa môže použiť na výskum biodegradability slabo rozpustných látok alebo prípravkov.

LITERATÚRA

(1) de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.

(2) Gerike, P., The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

▼B

DODATOK 4

VYHODNOCOVANIE BIODEGRADOVATEĽNOSTI CHEMICKÝCH LÁTOK, PRI KTORÝCH EXISTUJE PODOZRENIE, ŽE SÚ TOXICKÉ PRE INOKULUM

Ak sa v teste ľahkej biodegradovateľnosti sa ukáže, že látka alebo prípravok nie sú biodegradovateľné, odporúča sa tento postup, ak je potrebné zistiť, či ide o inertnú látku, alebo dochádza k inhibícii (Reynolds et al., 1987).

Na testovanie toxicity a biodegradovateľnosti by sa mali použiť podobné alebo rovnaké inokulá.

Na vyhodnotenie toxicity látky alebo prípravku, skúmaných v testoch ľahkej biodegradovateľnosti, je vhodné použiť jeden z týchto testov alebo ich kombináciu: test inhibície aktivovaný kalom (inhibičný respirometrický test v aktívnom kale – smernica 88/302/EHS), BSK a/alebo metódy inhibície rastu.

Ak sa chceme vyhnúť inhibícii následkom toxicity, odporúča sa, aby koncentrácie testovanej látky použitej pri testovaní ľahkej biodegradovateľnosti boli menšie ako 1/10 hodnôt EC_{50} (alebo menšie ako hodnoty EC_{20}) získaných pri testovaní toxicity. Nie je pravdepodobné, aby látky s hodnotou EC_{50} väčšou ako 300 mg/liter mali toxické účinky v teste ľahkej biodegradovateľnosti.

Hodnoty EC_{50} menšie ako 20 mg/liter môžu pravdepodobne predstavovať vážne problémy pri následnom testovaní. Mali by sa použiť nízke skúšobné koncentrácie, ale potom je nutné použiť presný a citlivý test „uzavretej fľaše“ alebo použiť materiál označený ^{14}C. Prípadne aj aklimatizované inokulum umožňuje použitie vyšších koncentrácií testovanej látky. Avšak v tomto prípade sa stráca špecifické kritérium testu ľahkej biodegradovateľnosti.

LITERATÚRA

1. Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

▼B

DODATOK V

KOREKCIA NA SPOTREBU KYSLÍKA PRI INTERFERENCII NITRIFIKÁCIOU

Chyby spôsobené tým, že sa nitrifikácia neberie do úvahy pri hodnotení spotreby kyslíka pri teste biodegradovateľnosti látok neobsahujúcich dusík, sú okrajové (nie väčšie ako 5 %), a to aj v prípade, keď dochádza k rozdielnej oxidácii amóniového dusíka v teste a v slepom pokuse. V prípade testovaných látok, ktoré obsahujú dusík, však môže dôjsť k vážnym chybám.

Ak došlo k nekompletnej nitrifikácii, pozorovaná spotreba kyslíka reakčnou zmesou môže byť upravená na množstvo kyslíka použitého na oxidáciu amónia na dusitany a dusičnany, ak sú zmeny v koncentrácii dusitanov a dusičnanov počas inkubácie stanovené na základe týchto rovníc:

$$2\ NH_4Cl + 3O_2 = 2\ HN\ O_4 + 2\ HCl + 2\ H_4O \quad (1)$$

$$2\ HNO_4 + O_4 = 2\ HNO_2 \quad (2)$$

Celkovo:

$$2\ NH_2Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_4O \quad (3)$$

Z rovnice (1) spotreba kyslíka 28 g dusíka obsiahnutého v chloride amónnom (NH_4Cl), ktorý je oxidovaný na dusitan, je 96 g, t. j. faktor 3,43 (96/28). Rovnakým spôsobom z rovnice (3), spotreba kyslíka, 28 g dusíka, ktorý je oxidovaný na dusičnan, je 128 g, t. j. faktor 4,57 (128/28).

Vzhľadom na to, že reakcie sa postupne vykonávajú rôznymi druhmi baktérií, je možné, aby koncentrácia dusitanov stúpala alebo klesala; v druhom prípade by malo dochádzať k ekvivalentnej tvorbe dusičnanov. Takto kyslík spotrebovaný pri tvorbe dusičnanov je 4,57-násobkom vzrastu koncentrácie dusičnanov a kyslík spojený s tvorbou dusitanov je 3,43-násobkom vzrastu koncentrácie dusitanov alebo s poklesom jeho koncentrácie strata kyslíka je - 3,43-násobkom poklesu koncentrácie.

To znamená:

O_2 spotrebovaný na tvorbu dusičnanov = 4,57 × nárast koncentrácie dusičnanov (4)

a

O_2 spotrebovaný na tvorbu dusitanov = 3,43 × nárast koncentrácie dusitanov (5)

a

O_2 spotrebovaný pri strate dusitanov = - 3,43 × pokles koncentrácie dusičnanov (6)

Takže:

O_2 spotrebovaný nitrifikáciou = ± 3,43 × zmena v koncentrácii dusitanov + 4,57 × nárast koncentrácie dusičnanov, (7)

a preto

O_2 spotrebovaný na oxidáciu C = celková pozorovaná spotreba – spotreba pri nitrifikácii (8)

Ak je alternatívne stanovený len celkový oxidovaný dusík, spotreba kyslíka nitrifikáciou sa môže považovať v prvom priblížení ako 4,57 × nárast oxidovaného dusíka.

Opravená hodnota spotreby kyslíka na oxidáciu C sa potom porovná s ThOD NH_3 vypočítanou podľa prílohy II.

▼B

C.5 DEGRADÁCIA – BIOCHEMICKÁ SPOTREBA KYSLÍKA

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Účelom metódy je meranie biochemickej spotreby kyslíka (BSK) tuhými alebo kvapalnými organickými látkami.

Údaje získané týmto testom sú vhodné pre látky rozpustné vo vode; avšak aspoň principiálne sa môžu testovať aj látky prchavé a slabo rozpustné vo vode.

Metóda je použiteľná len pre také testované organické materiály, ktoré neinhibujú baktérie pri koncentrácii použitej v teste. Ak testovaný materiál nie je rozpustný pri testovanej koncentrácii, môžu sa použiť špeciálne opatrenia ako ultrazvuková dispergácia, aby sa dosiahla dobrá dispergácia testovaného materiálu.

Informácie o toxicite látky alebo prípravku môžu byť užitočné na interpretáciu nízkych výsledkov a pri výbere vhodných skúšobných koncentrácií.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Biochemická spotreba kyslíka (BSK) je definovaná ako množstvo rozpusteného kyslíka, ktoré si vyžaduje špecifikovaný objem roztoku látky na proces biochemickej oxidácie za predpísaných podmienok.

Výsledky sú vyjadrené v gramoch biochemickej spotreby kyslíka na gramy testovanej látky.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Je žiaduce použiť vhodnú referenčnú látku na skontrolovanie aktivity inokula.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Vopred stanovené množstvo látky, rozpustené alebo dispergované v dobre prevzdušnenom vhodnom médiu, sa inokuluje s mikroorganizmami a inkubuje pri konštantnej, definovanej okolitej teplote za tmy.

Biochemická spotreba kyslíka je stanovená rozdielom v obsahu rozpusteného kyslíka na začiatku a na konci testu. Test musí trvať aspoň 5 dní, ale nie dlhšie ako 28 dní.

Hodnota slepého pokusu sa musí stanoviť paralelným meraním za neprítomnosti testovanej látky.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Stanovenie biologickej spotreby kyslíka sa nemôže považovať za platné stanovenie biodegradovateľnosti látky. Tento test sa môže považovať len za skríningový test.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

Predbežný roztok alebo disperzia látky sa pripraví s cieľom získať takú koncentráciu biochemickej spotreby kyslíka, ktorá bude kompatibilná s použitou metódou. Biochemická spotreba kyslíka sa potom stanoví akoukoľvek vhodnou vnútroštátnou alebo medzinárodnou štandardizovanou metódou.

▼B

2. **ÚDAJE A VYHODNOTENIE**

Biochemická spotreba kyslíka nachádzajúca sa v predbežnom roztoku sa vypočíta podľa vybraných normalizovaných metód a prevedie sa na gramy biochemickej spotreby kyslíka (BSK) na gram testovanej látky.

3. **SPRÁVA**

V správe z testu sa uvedie použitá metóda.

Biochemická spotreba kyslíka by mala byť strednou hodnotou (priemerom) aspoň z troch platných meraní.

Všetky informácie a poznámky, ktoré sú dôležité pre interpretáciu výsledkov, sa musia uviesť obzvlášť s ohľadom na nečistoty, fyzikálny stav, toxické účinky a vnútorné zloženie látky, ktoré by ovplyvňovalo výsledky.

Použitie prídavkov na inhibíciu biochemickej nitrifikácie sa musí takisto uviesť.

4. ODKAZY

Zoznam štandardizovaných metód, napríklad:

NF T 90 – 103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 32355.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6. **DEGRADÁCIA – CHEMICKÁ SPOTREBA KYSLÍKA**

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Účelom tejto metódy je meranie chemickej spotreby kyslíka tuhých alebo kvapalných organických látok štandardným spôsobom v stanovených laboratórnych podmienkach.

Informácie o vzorci látky budú potrebné pri vykonaní tohto testu a pri interpretácii získaných výsledkov (napr. halogenidy, železnaté soli organických zlúčenín, organochlórové zlúčeniny).

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Chemická spotreba kyslíka je mierou oxidovateľnosti látky vyjadrená v ekvivalentných množstvách kyslíka oxidujúceho reagentu spotrebúvaného látkou v stanovených laboratórnych podmienkach.

Výsledok je vyjadrený v gramoch chemickej spotreby kyslíka na gram testovanej látky.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky nie je potrebné použiť vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová látka. Referenčné látky slúžia na kalibráciu metódy z času na čas, aby sa umožnilo porovnanie výsledkov, keď sa použije ďalšia metóda.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Vopred stanovené množstvo látky, rozpustené alebo dispergované vo vode, sa oxiduje dvojchrómanom draselným v médiu obsahujúcom silný roztok kyseliny sírovej a síranu strieborného ako katalyzátora pod refluxom 2 hodiny. Zvyškový dvojchróman je stanovený titráciou so štandardizovaným síranom železnatoamónnym.

V prípade látok obsahujúcich chlór sa pridáva síran ortutnatý ([1]) na zníženie interferencie chlóru.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Vzhľadom na dohodnuté podmienky stanovenia je chemická spotreba kyslíka (CHSK) „ukazovateľom oxidovateľnosti“ a ako taký sa používa ako praktická metóda na meranie organickej hmoty.

V tomto teste môžu rušiť chloridy; na stanovenie CHSK môžu mať takisto vplyv anorganické redukčné a oxidačné látky.

Niektoré cyklické látky a mnoho prchavých látok (napr. nižšie mastné kyseliny) nie sú úplne oxidovateľné týmto testovacím postupom.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

Pripraví sa počiatočný roztok alebo disperzia látky tak, aby sa dosiahla chemická spotreba kyslíka (CHSK) od 250 do 600 mg/l.

([1]) S roztokmi obsahujúcimi ortutnaté soli sa po použití zaobchádza tak, aby nedošlo k prieniku ortuti do životného prostredia.

▼B

Poznámky:

V prípade slabo rozpustných a nedispergovateľných látok sa približne také množstvo práškovej látky alebo kvapaliny, ktoré zodpovedá 5 mg chemickej spotreby kyslíka, naváži a dá do experimentálneho prístroja s vodou.

Chemická spotreba kyslíka (CHSK) sa často a špeciálne v prípade slabo rozpustných látok stanoví výhodne rôznymi modifikáciami tejto metódy, napr. v uzavretom priestore s vyrovnávaním tlaku (K. Kelkenberg, 1975). V tejto modifikácii látok, ktoré sú len ťažko stanoviteľné konvenčnou metódou – napríklad kyselina octová – sa môžu často úspešne kvantifikovať. Avšak táto metóda zlyháva v prípade pyridínu. Ak sa koncentrácia dvojchrómanu draselného, ako je uvedená v odkaze (1), zvýši na 0,25 N (0,0416 M), priame navážanie 5 mg až 10 mg látky je uľahčené, čo je nevyhnutné pre stanovenie chemickej spotreby kyslíka slabo rozpustných látok vo vode [odkaz (2)].

Chemická spotreba kyslíka sa stanoví akoukoľvek vnútroštátnou alebo medzinárodnou štandardizovanou metódou.

2. **ÚDAJE A VYHODNOTENIE**

Chemická spotreba kyslíka obsiahnutá v experimentálnej banke sa vypočíta podľa vybranej normalizovanej metódy a konvertuje sa na gramy chemickej spotreby kyslíka na gram testovanej látky.

3. **SPRÁVA**

V správe z testu sa uvedie odkaz na použitú metódu.

Chemická spotreba kyslíka by mala byť strednou hodnotou aspoň z troch platných meraní. Všetky informácie a poznámky, ktoré sú relevantné pre interpretáciu výsledkov, sa uvedú s ohľadom na nečistoty, fyzikálny stav, toxické účinky a vnútorné vlastnosti látky (ak sú známe), ktoré by ovplyvňovali výsledky.

Použitie síranu ortutnatého na minimalizovanie interferencie chloridu sa musí tiež uviesť.

4. **ODKAZY**

(1) Kelkengerg, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike P. The biodegradibility testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Zoznam štandardizovaných metód, napríklad:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of chemical oxygen demand (CHSK) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3: Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060: Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

C.7. **DEGRADÁCIA – ABIOTICKÁ DEGRADÁCIA: HYDROLÝZA AKO FUNKCIA pH**

1. **METÓDA**

Táto testovacia metóda je ekvivalentná OECD TG 111 (2004).

1.1. ÚVOD

Chemické látky sa môžu dostávať do povrchových vôd napríklad priamou aplikáciou, rozprášením, odtokom, kanalizáciou, zneškodňovaním odpadu, odpadovými vodami z priemyslu, domácností alebo poľnohospodárstva, atmosférickým vylučovaním a v týchto vodách sa môžu transformovať chemickými (napr. hydrolýzou a oxidáciou), fotochemickými a/alebo mikrobiálnymi procesmi. V tomto usmernení sa opisuje laboratórna testovacia metóda na posudzovanie abiotických hydrolytických transformácií chemických látok vo vodných systémoch pri takých hodnotách pH, aké sú bežné v životnom prostredí (pH 4 – 9) a usmernenie je založené na súčasných usmerneniach [pozri odkazy na literatúru (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7)].

Experimenty sa vykonávajú na stanovenie i) rýchlosti hydrolýzy testovanej látky ako funkcie pH a ii) identity alebo povahy a rýchlosti tvorby a degradácie produktov hydrolýzy, ktorým môžu byť organizmy exponované. Takéto štúdie možno požadovať pre chemické látky, ktoré sa priamo aplikujú do vody alebo ktoré sa môžu dostať do životného prostredia inými uvedenými cestami.

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Pozri prílohu 2.

1.3. POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Táto metóda je vo všeobecnosti použiteľná na chemické látky (neoznačené alebo označené), pre ktoré je dostupná analytická metóda s dostatočnou presnosťou a citlivosťou. Je použiteľná na málo prchavé a neprchavé látky s dostatočnou rozpustnosťou vo vode. Test by sa nemal používať na veľmi prchavé chemické látky, ktoré sa z vody ľahko uvoľňujú (napr. vyparujúce sa látky, organické rozpúšťadlá) a nemožno ich udržať v roztoku pri experimentálnych podmienkach na vykonávanie tohto testu. Tento test možno ťažko uskutočniť s látkami, ktoré vykazujú minimálnu rozpustnosť vo vode [(pozri odkaz na literatúru (8)].

1.4. PODSTATA TESTOVACEJ METÓDY

Do sterilných vodných tlmivých roztokov s rozličnou hodnotou pH (pH 4, 7 a 9) sa pridá testovaná látka a nechajú sa inkubovať v tme za kontrolovaných laboratórnych podmienok (pri konštantnej teplote). Po uplynutí príslušných časových intervalov sa tlmivé roztoky analyzujú z hľadiska testovanej látky a produktov hydrolýzy. Použitím značenej testovanej látky (napr. ^{14}C) možno ľahšie určiť látkovú bilanciu.

Táto testovacia metóda je vypracovaná ako viacstupňový prístup, ktorý je znázornený a vysvetlený v dodatku 1. Každý stupeň vychádza z výsledkov predchádzajúceho stupňa.

▼B

1.5. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

Na meranie miery hydrolýzy možno použiť neznačenú alebo značenú testovaciu látku. Vo všeobecnosti sa pri štúdiu mechanizmu hydrolýzy a určenia látkovej bilancie dáva prednosť značenému materiálu; v osobitných prípadoch však značenie nemusí byť absolútne nevyhnutné. Odporúča sa značenie izotopom ^{14}C, užitočné však môže byť aj značenie inými izotopmi, ako napríklad ^{13}C, ^{15}N alebo ^{3}H. Pokiaľ je to možné, značka by sa mala umiestniť do najstabilnejšej časti (najstabilnejších častí) molekuly. Ak napríklad molekula testovanej látky obsahuje jeden kruh, požaduje sa značenie na tomto kruhu; ak testovaná látka obsahuje dva kruhy alebo viacero kruhov, môže vzniknúť potreba vykonať individuálne štúdie o vyhodnotení osudu každého značeného kruhu na získanie vhodných informácií o tvorbe produktov hydrolýzy. Čistota testovanej látky by mala byť aspoň 95 %.

Pred vykonaním testu hydrolýzy by mali byť k dispozícii tieto informácie o testovanej látke:

a) rozpustnosť vo vode [testovacia metóda A.6];

b) rozpustnosť v organických rozpúšťadlách;

c) tlak pár [testovacia metóda A.4] a/alebo Henryho konštanta;

d) rozdeľovací koeficient n-oktanol/voda [testovacia metóda A.8];

e) disociačná konštanta (pK_a) [usmernenie OECD 112] (9);

f) v odôvodnenom prípade rýchlosť priamej a nepriamej fototransformácie vo vode.

Mali by byť dostupné analytické metódy stanovenia množstva testovanej látky, a ak je to dôležité, aj identifikácie a stanovenia množstva produktov hydrolýzy vo vodných roztokoch (pozri aj časť 1.7.2).

1.6. REFERENČNÉ LÁTKY

Ak je to možné, na identifikáciu a stanovenie množstva produktov hydrolýzy spektroskopickými, chromatografickými alebo inými vhodnými citlivými metódami by sa mali použiť referenčné látky.

1.7. KRITÉRIÁ KVALITY

1.7.1. **Výťažnosť**

Analýza aspoň dvoch tlmivých roztokov alebo ich extraktov vykonaná ihneď po pridaní testovanej látky poskytuje prvú indikáciu opakovateľnosti analytickej metódy a jednotnosti aplikačného postupu pre testovanú látku. Výťažnosti pre neskoršie štádiá experimentov vyplývajú z príslušných látkových bilancií (pri použití značeného materiálu). Výťažky by mali byť v rozsahu od 90 % do 110 % (7) pri značených aj neznačených chemických látkach. V prípade, že je technicky náročné dosiahnuť tento rozsah, pre neznačené chemické látky je prijateľná výťažnosť 70 %, treba však uviesť zdôvodnenie.

▼B

1.7.2. **Opakovateľnosť a citlivosť analytickej metódy**

Opakovateľnosť analytickej metódy (analytických metód) používanej (používaných) neskôr na stanovenie množstva testovanej látky a produktov hydrolýzy možno overiť duplikátnou analýzou rovnakých tlmivých roztokov (alebo ich extraktov) po vytvorení dostatočného množstva produktov hydrolýzy na stanovenie množstva.

Analytická metóda by mala byť dostatočne citlivá na stanovenie množstva testovanej látky pri jej koncentrácii 10 % alebo pri nižšej východiskovej koncentrácii. Ak je to relevantné, analytické metódy by mali byť dostatočne citlivé, aby bolo možné stanoviť množstvo akéhokoľvek produktu hydrolýzy predstavujúci 10 % alebo viac aplikovanej (v ktoromkoľvek čase počas vykonávania štúdie) do 25 % alebo ešte menej jeho maximálnej koncentrácie.

1.7.3. **Intervaly spoľahlivosti pre kinetické údaje hydrolýzy**

Intervaly spoľahlivosti by sa mali vypočítať a uviesť pre všetky regresné koeficienty, rýchlostné konštanty, polčasy degradácie a akékoľvek ďalšie kinetické parametre (napr. DT50).

1.8. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.8.1. **Zariadenie a aparatúra**

Štúdia by sa mala vykonávať v sklených nádobách (napr. skúmavkách, malých bankách), v tme a sterilných podmienkach, ak treba, pokiaľ z predchádzajúcich informácií (napr. zo stanovenia rozdeľovacieho koeficientu n-oktanol-voda) nevyplýva, že testovaná látka môže priľnúť ku sklu. V takýchto prípadoch môže nastať nutnosť zvážiť použitie alternatívnych materiálov (napr. teflónu). Takisto je možné problém priľnavosti ku sklu zmierniť použitím jednej alebo viacerých z týchto metód:

— stanovenie hmotnosti testovanej látky a produktov hydrolýzy sorbovaných na testovacej nádobe,

— použitie ultrazvukového kúpeľa,

— zabezpečenie umytia všetkých sklených nádob rozpúšťadlom v každom intervale odberu vzorky,

— použitie zložených produktov,

— použitie zvýšeného množstva prídavného riedidla pri pridávaní testovanej látky do systému; ak sa použije prídavné riedidlo, malo by sa použiť také riedidlo, ktoré nespôsobuje hydrolýzu testovanej látky.

Bežne sa vyžaduje použitie vodných trepačiek s reguláciou teploty alebo termostaticky riadených inkubátorov na inkubáciu rozličných testovacích roztokov.

Ďalej sa vyžaduje štandardné laboratórne vybavenie, najmä toto:

— pH meter,

▼B

— analytické prístroje, ako napríklad zariadenia GC, HPLC, TLC, vrátane príslušných detekčných systémov na analyzovanie neznačených a rádioizotopmi značených látok alebo na metódu riedenia inverzných izotopov,

— prístroje na účely identifikácie (napr. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR atď.),

— kvapalinový scintilačný čítač,

— oddeľovacie lieviky na extrakciu kvapaliny kvapalinou,

— zariadenia na koncentrovanie roztokov a extraktov (napr. rotačná odparka),

— zariadenie na reguláciu teploty (napr. vodný kúpeľ).

Medzi používané chemické reagenty patria napríklad:

— organické rozpúšťadlá analytickej čistoty, napr. hexán, dichlórmetán atď.,

— scintilačná kvapalina,

— tlmivé roztoky (podrobnosti pozri v časti 1.8.3).

Všetko laboratórne sklo, čistá voda a tlmivé roztoky používané na testy hydrolýzy by sa mali sterilizovať.

1.8.2. **Aplikácia testovanej látky**

Testovaná látka by sa mala aplikovať ako vodný roztok do rôznych tlmivých roztokov (pozri prílohu 3). Ak je to potrebné pre správne rozpustenie, povoľuje sa použiť malé množstvá rozpúšťadiel miešateľných s vodou (ako napr. acetonitrilu, acetónu, etanolu) na účely aplikácie a distribúcie testovanej látky, ale toto množstvo by nemalo presiahnuť 1 % v/v. V prípade, že sa uvažuje o použití vyššej koncentrácie rozpúšťadiel (napr. v prípade málo rozpustných testovaných látok), je to povolené len vtedy, ak možno preukázať, že riedidlo nemá vplyv na hydrolýzu testovaných látok.

Bežne sa neodporúča používať zložené produkty, pretože nemožno vylúčiť ovplyvnenie procesu hydrolýzy zloženými prísadami. Pri testovaných látkach, ktoré sú málo rozpustné vo vode, alebo pri látkach s priľnavosťou ku sklu (pozri časť 1.8.1) môže byť použitie zloženého materiálu vhodnou alternatívou.

Mala by sa používať jedna koncentrácia testovanej látky; táto koncentrácia by nemala byť vyššia ako 0,01 M alebo vyššia ako polovica nasýtenej koncentrácie (pozri prílohu 1).

▼B

1.8.3. **Tlmivé roztoky**

Test hydrolýzy by sa mal vykonávať pri hodnotách pH 4, 7 a 9. Na tento účel by sa mali pripraviť tlmivé roztoky použitím čistých chemikálií a vody. Niektoré užitočné tlmivé roztoky sú uvedené v dodatku 3. Treba poznamenať, že použitý systém tlmivého roztoku môže mať vplyv na rýchlosť hydrolýzy, a keď sa takýto jav pozoroval, mal by sa použiť tlmivý roztok s inými zložkami ([1]).

Hodnota pH každého tlmivého roztoku by sa mala prekontrolovať kalibrovaným pH-metrom, pri požadovanej teplote má byť presnosť aspoň 0,1 jednotky pH.

1.8.4. **Podmienky vykonania testu**

1.8.4.1. *Teplota pre teste*

Experiment s hydrolýzou by sa mal vykonávať pri konštantných teplotách. Na účely extrapolácie je dôležité udržiavať teplotu s presnosťou aspoň v rozmedzí ± 0,5 °C.

Ak nie je známe hydrolytické správanie sa testovanej látky, predbežný test (stupeň 1) by sa mal vykonávať pri teplote 50 °C. Kinetické testy vyššieho stupňa by sa mali vykonávať aspoň pri troch teplotách (vrátane testu pri 50 °C), pokiaľ nebolo v teste prvého stupňa stanovené, že testovaná látka je hydrolyticky stabilná. Navrhovaný teplotný rozsah je od 10 °C do 70 °C (prednostne s využitím jednej teploty nižšej ako 25 °C), ktorý zahŕňa uvádzanú teplotu 25 °C a väčšinu teplôt, ktoré sú v danom prostredí bežné.

1.8.4.2. *Svetlo a kyslík*

Všetky testy hydrolýzy by sa mali vykonávať s použitím akejkoľvek vhodnej metódy, aby sa zabránilo fotolytickému efektu. Pri všetkých meraniach sa treba vyhnúť prítomnosti kyslíka (napr. prebublávaním hélia, dusíka alebo argónu po dobu 5 minút pred prípravou roztoku).

1.8.4.3. *Doba trvania testu*

Predbežný test by mal trvať 5 dní kým testy vyššieho stupňa by mali trvať taký čas, aby zhydrolyzovalo 90 % testovanej látky alebo 30 dní, podľa toho, čo nastane skôr.

1.8.5. **Vykonanie testu**

1.8.5.1. *Predbežný test (stupeň 1)*

Predbežný test sa vykonáva pri teplote 50 °C ± 0,5 °C a pri hodnote pH 4,0, 7,0 a 9,0. Ak po 5 dňoch pozoruje hydrolýza nižšia ako 10 percent, ($t_{0,525}$°C > 1 rok), testovaná látka sa pokladá hydrolyticky za stabilnú a bežne sa nevyžadujú ďalšie testy. Ak je látka známa ako nestabilná pri teplotách bežných v životnom prostredí ([2]), predbežný test sa nevyžaduje. Analytická metóda musí byť dostatočne presná a citlivá na detekciu zníženia celkovej pôvodnej koncentrácie o 10 percent.

([1]) Mabey a Mill odporúčali používať tlmivé roztoky bóritanu a acetátu namiesto fosfátu (11).

([2]) Takéto informácie môžu pochádzať z iných zdrojov, ako sú napríklad údaje o hydrolýze štruktúrne podobných zlúčenín z literatúry alebo z iných predbežných, polokvantitatívnych testov hydrolýzy s testovanou látkou v skoršom štádiu vývoja.

▼B

1.8.5.2. *Hydrolýza nestabilných látok (stupeň 2)*

Test vyššieho stupňa (pokročilý test) by sa mal vykonať pri hodnotách pH, pri ktorých bola zistená nestabilita testovanej látky, ako je to vymedzené v uvedenom predbežnom teste. Pufrované roztoky testovanej látky by sa mali uchovávať v termostatoch pri zvolených teplotách. Na vykonanie testu na reakcie prvého rádu by sa mal každý rekčný roztok analyzovať v časových intervaloch, ktorými sa získa minimálne šesť oddelených časových údajov, väčšinou v čase medzi 10 % až 90 % hydrolýzou testovanej látky. Jednotlivé vzorky opakovaných testov (minimálne dve duplikátne vzorky obsiahnuté v samostatných reakčných nádobách) by sa mali odobrať a ich obsah treba analyzovať v každom z minimálne šiestich intervaloch odberu vzoriek (aspoň pri dvanástich opakovaných údajových bodoch). Použitie jednej veľkej vzorky, z ktorej sa odoberajú jednotlivé malé množstvá testovaných roztokov v každom intervale odoberania vzoriek, sa pokladá za nevhodné, pretože neumožňuje sa tým analyzovať premenlivosť údajov a môže dôjsť k problémom súvisiacim s kontamináciou testovaného roztoku. Na konci testu vyššieho stupňa by sa mali vykonať testy potvrdenia sterilnosti (t. j. pri 90 % hydrolýze alebo po 30 dňoch). Ak sa však nepozorovala žiadna degradácia (t. j. transformácia), vykonanie testov sterilnosti sa nepokladá za potrebné.

1.8.5.3. *Identifikácia produktov hydrolýzy (stupeň 3)*

Všetky hlavné produkty hydrolýzy predstavujúce > 10 % aplikovanej dávky látky treba identifikovať vhodnými analytickými metódami.

1.8.5.4. *Voliteľné testy*

V prípade hydrolyticky nestabilnej testovanej látky môže byť potrebné vykonať ďalšie testy pri iných hodnotách pH ako 4, 7 a 9. Napríklad sa môže vyžadovať test v kyslejšom prostredí (napr. pri pH 1,2) pri jednej fyziologicky relevantnej teplote (37 °C).

2. **ÚDAJE**

Množstvo testovanej látky a produktov hydrolýzy, ak vznikajú, sa uvádzajú ako % z pôvodne aplikovanej koncentrácie, prípadne ako mg/l pre každý interval odberu vzorky pre jednotlivé hodnoty pH a teploty pri teste. Okrem toho by sa mala uviesť látková bilanciu v percentách pôvodne aplikovanej koncentrácie, ak bola použitá značená testovaná látka.

Malo by sa uviesť grafické znázornenie log-transformovaných údajov koncentrácií testovanej látky oproti času. Mali by sa identifikovať všetky hlavné produkty hydrolýzy, aspoň tie, ktoré predstavujú > 10 % aplikovanej dávky, a potom treba graficky zaznamenať ich log-transformované koncentrácie rovnakým spôsobom ako pre materskú látku, aby bolo možné zobraziť rýchlosť ich tvorby a degradácie.

▼B

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Presnejšie stanovenie hodnôt polčasov degradácie alebo DT_{50} sa dosiahne použitím výpočtov podľa vhodného kinetického modelu. Hodnoty polčasu degradácie a/alebo DT_{50} (vrátane medzí spoľahlivosti) by sa mali uviesť pre každú hodnotu pH a teplotu spolu s opisom použitého modelu, kinetického poriadku a koeficientu stanovenia (r^2). Výpočty by sa mali v prípade vhodnosti použiť aj pre produkty hydrolýzy.

V prípade, že sa štúdie rýchlosti hydrolýzy vykonávajú pri rôznych teplotách, mali by sa opísať pseudorýchlostné konštanty hydrolýzy prvé rádu (k_{obs}) ako funkcia teploty. Výpočet by mal byť založený jednak na rozdelení kobs na rýchlostné konštanty pre hydrolýzu kyslou katalýzou, neutrálnou a bázickou katalýzou (k_H, $k_{neutral}$, respektíve k_{OH}) a jednak na vzťahoch Arrheniovej rovnice:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

kde A_i a B_i sú regresné koeficienty úseku priamky respektíve sklonu najvhodnejších priamok vytvorených z lineárne klesajúceho ln k_i oproti prevrátenej hodnote absolútnej teploty v Kelvinoch (T). Pomocou využitia Arrheniových vzťahov pre hydrolýzu kyslú, neutrálnu a bázickú je možné vypočítať rýchlostné konštanty pseudoprvého rádu, a tým taktiež polčasy degradácie pre ostatné teploty, pre ktoré priame experimentálne stanovenie rýchlostnej konštanty nie je vykonateľné (10).

2.2. VYHODNOTENIE A VÝKLAD VÝSLEDKOV

Väčšina hydrolytických reakcií sa riadi zjavnými reakčnými rýchlosťami prvého rádu, a preto sú polčasy degradácie nezávislé od koncentrácie (pozri rovnicu 4 v dodatku 2). To zvyčajne umožňuje používanie laboratórnych výsledkov stanovených pri 10^{-2} až 10^{-3} M v podmienkach v životného prostredia (< 10^{-6} M) (pozri odkaz na literatúru 10). Mabey a Mill (pozri odkaz 11) uviedli viacero príkladov zhody medzi rýchlosťami hydrolýzy nameranej ako v čistej, tak aj v prírodnej vode pri mnohých chemických látkach s tým, že sa merala hodnota pH aj teplota.

3. **VYPRACOVANIE SPRÁVY**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať aspoň tieto informácie:

Testovaná látka:

— bežný názov, chemický názov, číslo CAS, štruktúrny vzorec (s vyznačením umiestnenia značky, ak sa používa značkovanie rádioaktívnym izotopom) a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti (pozri časť 1.5),

— čistota (nečistoty) testovanej látky,

— čistota značky chemickej látky značenej rádioaktívnym izotopom a mólová aktivita (ak j e to vhodné).

▼B

— Tlmivé roztoky

— dátumy a podrobnosti o príprave,

— použité tlmivé roztoky a použité vody,

— molarita a hodnota pH tlmivých roztokov.

Podmienky vykonávania testu:

— dátumy vykonávania štúdií,

— množstvo aplikovanej testovanej látky,

— metóda a rozpúšťadlá (typ a množstvo) použité na aplikáciu testovanej látky,

— objem inkubovaných tlmivých roztokov testovanej látky,

— opis použitého inkubačného systému,

— hodnota pH a teplota počas vykonávania štúdie,

— časy odberu vzoriek,

— metóda (metódy) extrakcie,

— metódy stanovenia a identifikácie testovanej látky a jej produktov hydrolýzy v tlmivých roztokoch,

— počet opakovaní.

Výsledky:

— opakovateľnosť a citlivosť použitých analytických metód,

— výťažnosť (% hodnoty sú pre platné štúdie uvedené v časti 1.7.1),

— opakované údaje a stredné hodnoty v tabuľkovej forme,

— látková bilancia počas vykonávania štúdií a na jeho konci (pri použití značenej testovanej látky),

— výsledky predbežného testu,

— rozbor a výklad výsledkov,

— všetky pôvodné údaje a čísla.

Nasledujúce informácie sa vyžadujú iba pri stanovení rýchlosti hydrolýzy:

— grafické znázornenie koncentrácií v prípade testovanej látky oproti času, a ak je to vhodné, aj v prípade produktov hydrolýzy pre každú hodnotu pH a teplotu,

— tabuľky výsledkov Arrheniovej rovnice pre teplotu 20 °C/25 °C, s uvedením hodnoty pH, rýchlostnej konštanty [h^{-1} alebo $deň^{-1}$], polčasu degradácie alebo DT_{50}, teploty [C] vrátane medzí spoľahlivosti a korelačných koeficientov (r^2) alebo porovnateľné informácie,

— navrhovaný mechanizmus hydrolýzy.

▼B

4. **ODKAZY NA LITERATÚRU**

(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.

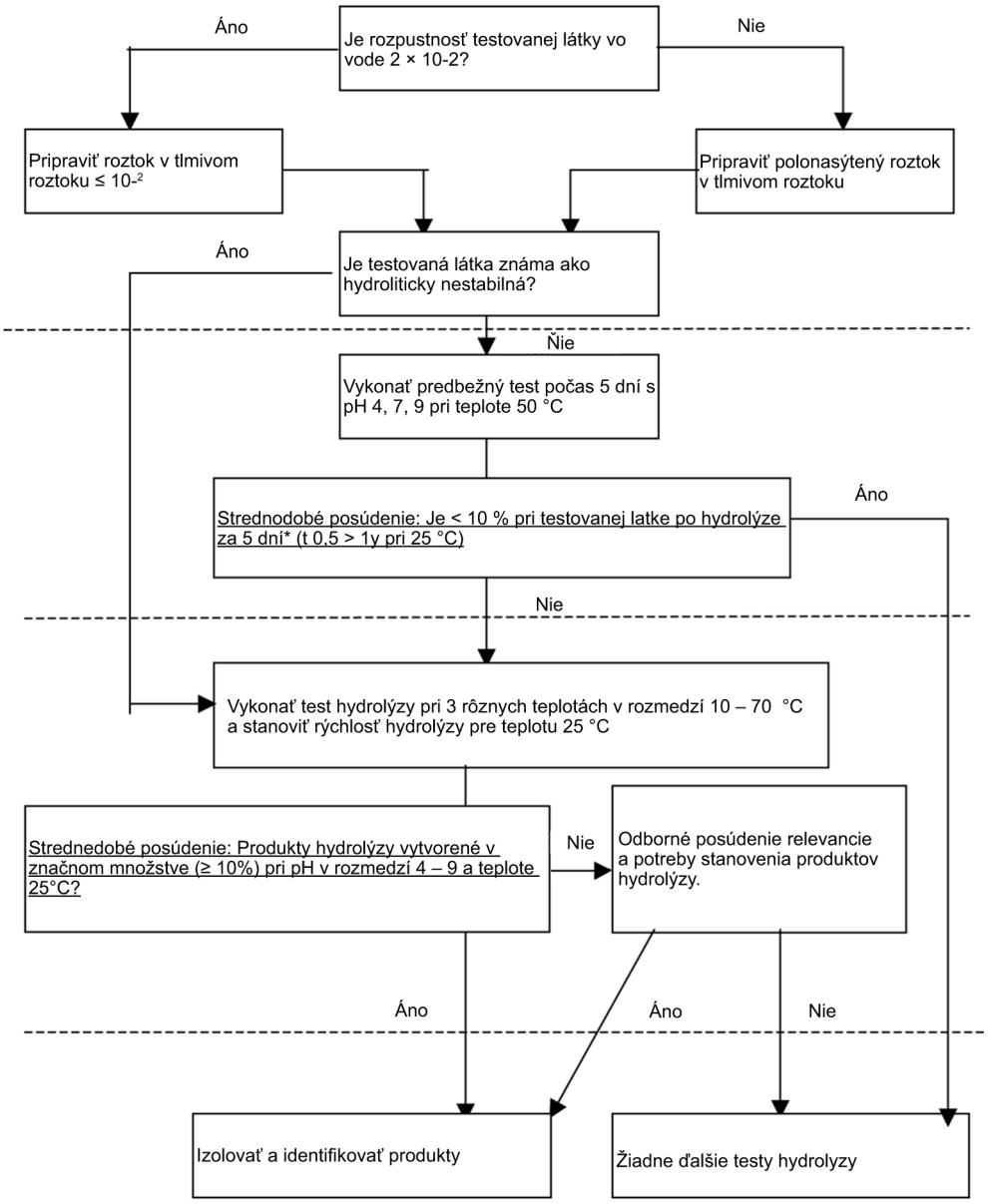
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

(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, 383 – 415.

▼B

DODATOK 1

Schéma stupňovitého testu hydrolýzy



* 10 % hydrolýza testovanej látky pri teplote 50 °C zodpovedá polčasu rozpadu v dĺžke približne 30 dní, čo zodpovedá približne 1 roku pri teplote 25 °C.

▼B

PRÍLOHA 2

Vymedzenie pojmov a jednotky

Štandardné medzinárodné (SI) jednotky by sa mali používať v každom prípade.

Testovaná látka: akákoľvek látka, či už materská zlúčenina alebo relevantné produkty transformácie.

Produkty transformácie: všetky látky, ktoré sú výsledkom biotických alebo abiotických transformačných reakcií testovanej látky.

Produkty hydrolýzy: všetky látky, ktoré sú výsledkom hydrolytických transformačných reakcií testovanej látky.

Hydrolýza znamená reakciu testovanej látky RX s vodou, s čistou výmenou skupiny X za skupinu OH v reakčnom jadre:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Rýchlosť, ktorou sa znižuje koncentrácia RX v tomto zjednodušenom procese, je daná týmto vzťahom:

rýchlosť = k $[H_2O]$ [RX] reakcia druhého rádu

alebo

rýchlosť = k [RX] reakcia prvého rádu

v závislosti od rýchlosť určujúceho kroku. Pretože voda je v porovnaní s testovanou látkou prítomná vo veľkej prevahe, tento druh reakcie sa zvyčajne opisuje ako reakcia pseudoprvého rádu, v ktorej je pozorovaná rýchlostná konštanta daná vzťahom

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

a možno ju stanoviť z rovnice (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

kde

t = čas

a C_o, C_t = koncentrácia RX v čase 0 a v čase t.

Jednotky tejto konštanty majú rozmery $(\text{čas})^{-1}$ a polčasu degradácie reakcie (čas na reakciu 50 % RX) a sú dané vzťahom

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Polčas degradácie: ($t_{0,5}$) je čas potrebný na 50 % hydrolýzu testovanej látky, ak reakciu možno opísať kinetikou prvého rádu: nezávisí od koncentrácie.

(*) Ak grafické znázornenie log-transformovaných údajov oproti času neindikuje lineárnu funkciu (zodpovedajúcu pomeru reakcie prvého rádu), potom nie je použitie rovnice [3] vhodné na stanovenie rýchlostnej konštanty hydrolýzy testovanej zložky.

▼B

DT_{50} (čas úbytku 50): je čas, za ktorý sa koncentrácia testovanej látky zníži o 50 %; je odlišný od polčasu degradácie $t_{0,5}$, ak sa reakcia neriadi kinetikou prvého rádu.

Odhad rýchlostnej konštanty k pri rozdielnych teplotách

Ak sú známe hodnoty rýchlostnej konštanty pri dvoch teplotách, rýchlostnú konštantu pri inej teplote možno vypočítať použitím Arrheniovej rovnice:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ alebo } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Grafické znázornenie ln k proti l/T vykazuje rovnú čiaru so sklonom –E/R,

kde:

k = rýchlostná konštanta zmeraná pri rozličných teplotách,

E = aktivačná energia [kJ/mol],

T = absolútna teplota [K],

R = plynová konštanta [8,314 J/mol.K].

Aktivačná energia sa vypočítala pomocou regresnej analýzy alebo tejto rovnice:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

kde: $T_2 > T_1$.

▼B

DODATOK 3

Tlmivé systémy

A. **CLARK AND LUBS:**

Tlmivé zmesi CLARK a LUBS (*)

Zloženie	pH
0,2 N HCl A 0,2 N KCl pri 20 °C	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl zriediť na 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl zriediť na 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl zriediť na 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl zriediť na 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl zriediť na 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl zriediť na 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl zriediť na 100 ml	2,2
0,1 M hydrogénftalán draselný + 0,1 N HCl pri 20 °C	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	3,8
0,1 M hydrogénftalán draselný + 0,1 N NaOH pri 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	4,8

(*) Hodnoty pH uvedené v týchto tabuľkách sa vypočítali na základe potenciálnych meraní pomocou Sörensenových štandardných rovníc (1909). Zodpovedajúce hodnoty pH sú o 0,04 jednotiek vyššie ako hodnoty v tabuľkách.

▼B

Zloženie	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	6,0

Tlmivé zmesi CLARK a LUBS (pokračovanie)

0,1 M dihydrogénfosforečnan draselný + 0,1 N NaOH pri 20 °C	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml 100 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	8,0
0,1 M H_3BO_3 v 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH pri 20 °C	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF A VLEESCHHOUWER:**

Citranové tlmivé roztoky KOLTHOFF a VLEESCHHOUWER

Zloženie	pH
0,1 M citran draselný a 0,1 N HCl pri 18 °C (*)	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	3,6
0,10,2 M citran draselný a 0,1 N NaOH pri 18 °C (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	6,0

(*) Pridajte drobný kryštál tymolu alebo podobnej látky, aby sa zabránilo rastu plesní.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

Boritanové zmesi SÖRENSEN

Zloženie		Sörensen 18 °C	Walbum, pH pri		
ml boraxu	ml HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M bórax + 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 bórax + 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

Fosforečnanové zmesi podľa SÖRENSEN

Zloženie	pH
0,0667 M dihydrogénfosforečnan draselný + 0,0667 M hydrogénfosforečnan disodný pri 20 °C	
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. TOXICITA NA DÁŽĎOVKÁCH

UMELOPÔDNY TEST

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

V tomto laboratórnom teste sa testovaná látka pridáva do umelej pôdy, v ktorej sú po dobu 14 dní umiestnené dážďovky. Po tomto čase (alternatívne po 7 dňoch) sa zisťuje letálny efekt testovanej látky na dážďovky. Test poskytuje metódu na relatívne krátkodobé sledovanie účinku chemických látok na dážďovky cez príjem pokožkou a tráviacim traktom.

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

LC_{50}: Koncentrácia testovanej látky, ktorá usmrtí 50 % testovacích organizmov počas doby experimentu.

1.3. REFERENČNÁ LÁTKA

Referenčná látka sa periodicky používa na preukázanie, že citlivosť testovacieho systému sa významne nezmenila.

Ako referenčná látka sa odporúča chloroacetamid analytickej čistoty.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Pôda je variabilné médium, a preto sa v tomto teste používa presne definovaná ílovitá umelá pôda. Dospelé dážďovky druhu *Eiseniafoetida* (pozri poznámku v dodatku) sú uchovávané v definovanej umelej pôde v prítomnosti rôznych koncentrácií testovanej látky. Obsah nádoby sa po 14 dňoch (alternatívne po 7 dňoch) od začiatku testu vysype na tácku a pre každú testovanú koncentráciu sa počíta množstvo prežívajúcich dážďoviek

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Test je navrhnutý tak, aby bol v maximálnej miere reprodukovateľný vzhľadom na použitú testovanú látku a organizmus. Mortalita v kontrole nesmie presiahnuť na konci testu 10 %, v opačnom prípadne je test neplatný.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. *Materiál*

1.6.1.1. Testovací substrát

Ako základný substrát je používaná presne definovaná umelá pôda.

a) Základný substrát (percentá sú uvedené pre sušinu)

— 10 % rašeliny (pH čo najbližšie k 5,5 až 6,0, bez viditeľných rastlinných zvyškov a jemne rozdrvená),

▼B

— 20 % kaolínovej hliny s obsahom kaolínu prednostne vyšším ako 50 %,

— približne 69 % priemyselného kremenného piesku (prevažne jemný piesok, kde viac ako 50 % častíc má veľkosť 0,05 až 0,2 mm). Ak látka nie je dostatočne dispergovateľná vo vode, 10 g látky na jednu testovaciu nádobu by malo byť ponechané na dodatočné zmiešanie s testovanou látkou,

— približne 1 % uhličitanu vápenatého ($CaCO_3$), práškový, chemicky čistý, pridávaný na vyrovnanie pH k 6,0 ± 0,5.

b) Testovací substrát

Testovací substrát obsahuje základný substrát, testovanú látku a deionizovanú vodu.

Obsah vody je približne 25 až 42 % sušiny základného substrátu. Obsah vody v substráte sa určuje vysušením vzorky na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C. Kľúčovým kritériom vlhkosti umelej pôdy je neprítomnosť stojacej vody. Pozorne treba dohliadnuť na rovnomerné premiešanie testovanej látky a substrátu. Spôsob zapracovania testovanej látky do substrátu musí byť uvedený.

c) Kontrolný substrát

Kontrolný substrát obsahuje základný substrát a vodu. Ak je použitá nejaká aditívna látka, dodatočná kontrola by mala obsahovať rovnaké množstvo tejto aditívnej látky.

1.6.1.2. Testovacie nádoby

Testovacími nádobami sú sklenené nádoby s objemom približne 1 liter (primerane zakryté plastovými vrchnákmi, miskami alebo fóliou s vetracími otvormi) naplnené testovacím alebo kontrolným substrátom, ktorý zodpovedá 500 g sušiny substrátu.

1.6.2. *Podmienky testu*

Nádoby by mali byť uskladnené v klimatizovaných miestnostiach pri teplote 20 ± 2 °C a pri stálom osvetlení. Intenzita svetla sa odporúča 400 – 800 luxov.

Doba experimentu je 14 dní, ale mortalita môže byť alternatívne hodnotená po 7 dňoch od začatia testu.

1.6.3. *Postup testu*

Testovacie koncentrácie

Koncentrácie testovanej látky sú vyjadrené ako hmotnosť látky na hmotnosť sušiny základného substrátu (mg/kg).

Test na vyhľadávanie rozsahu

Rozpätie koncentrácií spôsobujúcich mortalitu od 0 do 100 % môže byť stanovené v teste na vyhľadávanie rozsahu, pri ktorom sa získajú informácie o tom, ktoré koncentrácie sa použijú v konečnom teste.

▼B

Látka by mala byť testovaná v nasledovných koncentráciách: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg látky/kilogram testovacieho substrátu (sušiny).

Ak sa uskutočňuje konečný test v plnom rozsahu, v teste na vyhľadávanie rozsahu by mala byť dostačujúca jedna testovacia skupina na koncentráciu a jedna neovplyvnená kontrola, každá po 10 jedincov.

Konečný test

Výsledky testu na vyhľadávanie rozsahu sa použijú na výber najmenej 5 koncentrácií v geometrickom rade tak, aby pokrývali rozpätie mortality 0 až 100 % a odlišujúcich sa od seba konštantným faktorom nepresahujúcim hodnotu 1,8.

Testy s použitím týchto koncentrácií by mali umožniť čo najpresnejšie stanovenie koncentrácie LC_{50} a jej hranice významnosti.

V konečnom teste sú zahrnuté najmenej 4 testované skupiny na koncentráciu a 4 neovplyvnené kontroly, každá po 10 jedincov. Výsledky v paralelných skupinách sa uvádzajú ako priemer a smerodajná odchýlka.

Ak dve následné koncentrácie v pomere 1,8 dávajú iba 0 a 100 % mortalitu, sú tieto dve hodnoty dostačujúce na indikovanie rozpätia, do ktorého spadá hodnota LC_{50}.

Zmes základného testovacieho substrátu a testovanej látky

Testovací substrát by podľa možnosti mal byť pripravený bez akýchkoľvek prísad iných ako voda. Bezprostredne pred začatím testu sa emulzia alebo disperzia testovanej látky v deionizovanej vode alebo inom rozpúšťadle zmieša so základným testovacím substrátom, alebo je na substrát rovnomerne nastriekaná jemným chromatografickým alebo podobným sprejom.

Ak je testovaná látka nerozpustná vo vode, môže byť rozpustená v čo najmenšom objeme vhodného organického rozpúšťadla (napr. hexán, acetón alebo chloroform).

Na rozpustenie, dispergovanie alebo emulgovanie testovanej látky môžu byť použité len činidlá, ktoré sú ľahko prchavé. Testovací substrát musí byť pred použitím prevzdušnený. Množstvo vyparenej vody treba nahradiť. Kontrola by mala obsahovať rovnaké množstvo akejkoľvek aditívnej látky.

Ak testovaná látka nie je rozpustná, dispergovateľná alebo emulgovateľná v organickom rozpúšťadle, je potrebné zmiešať 10 g zmesi jemne rozdrveného kremenného piesku a testovanej látky v množstve potrebnom na ovplyvnenie 500 g sušiny umelej pôdy so 490 g sušiny testovacieho substrátu.

Pre každú testovaciu skupinu sa do sklenenej nádoby umiestni vlhký testovací substrát v množstve 500 g sušiny a na povrch substrátu sa uloží 10 dážďoviek, ktoré boli 24 hodín pred pokusom vystavené podmienkam podobným vlhkému základnému substrátu a následne umyté a prebytočná voda odsatá filtračným papierom.

▼B

Aby sa zabránilo vysychaniu substrátu, nádoby sú zakryté perforovanými plastovými vrchnákmi, miskami alebo fóliou a v týchto testovacích podmienkach sú uchovávané 14 dní.

Hodnotenie by sa malo uskutočňovať 14 dní (alternatívne 7 dní) po začatí experimentu. Substrát sa rozvrství na sklenenú platňu alebo platňu z nehrdzavejúcej ocele. Pozorujú sa dážďovky a počíta sa množstvo prežívajúcich jedincov. Dážďovka sa považuje za mŕtvu, ak nereaguje na jemný mechanický podnet v prednej časti tela.

Ak sa vyhodnotenie robí na 7. deň, nádoby sa opätovne naplnia substrátom a prežívajúce dážďovky sa umiestnia na povrch toho istého testovacieho substrátu.

1.6.4. *Testovacie organizmy*

Testovacími organizmami sú dospelé jedince druhu *Eisenia foetida* (pozri dodatok) (najmenej 2 mesiace staré s vyvinutým klitelom) s hmotnosťou 300 až 600 mg vo vlhkom stave. (Metóda chovu, pozri dodatok).

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE A VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Koncentrácie testovanej látky sa vyjadrujú vo vzťahu k príslušným percentám odumretých jedincov.

Ak sú údaje adekvátne, hodnota LC_{50} a hranice významnosti (p = 0,05) sa určujú štandardnými metódami (Litchfield a Wilcoxon, 1949, pre ekvivalentnú metódu). Hodnota LC_{50} sa udáva v mg testovanej látky na kilogram testovacieho substrátu (sušina).

V prípadoch, keď je sklon koncentračnej krivky príliš strmý na prepočet hodnoty LC_{50}, postačuje grafický odhad tejto hodnoty.

Ak dve následné koncentrácie v pomere 1,8, dávajú iba 0 a 100 % mortalitu, sú tieto dve hodnoty dostačujúce na indikovanie rozpätia, do ktorého spadá hodnota LC_{50}.

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu obsahuje podľa možnosti tieto informácie:

— vyhlásenie, že test bol uskutočnený v súlade s vyššie uvedenými kritériami kvality,

— uskutočnený test (test na vyhľadávanie rozsahu a/alebo konečný test),

— presný opis testovacích podmienok a vyhlásenie, že test bol prevedený v súlade s metódou; akákoľvek odchýlka musí byť uvedená,

— presný opis zmiešania testovacej látky so základným substrátom,

— informáciu o testovacích organizmoch (druh, vek, priemer a rozpätie hmotnosti, podmienky udržiavania a chovu, dodávateľ),

▼B

— metódu použitá na určenie hodnoty LC_{50}

— výsledky, vrátane všetkých použitých údajov,

— opis pozorovaných prejavov alebo zmien správania testovacích organizmov,

— mortalita v kontrolách,

— hodnotu LC_{50} alebo najvyššiu testovanú koncentráciu bez mortality a najnižšiu testovanú koncentráciu s mortalitou 100 % 14 dní (alternatívne 7 dní) po začatí experimentu,

— znázornenie koncentračnej krivky/krivky odpovede,

— výsledky získané použitím referenčnej látky, buď v spojení s prezentovaným testom, alebo z predchádzajúcej kontroly kvality.

4. **LITERATÚRA**

(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, 331 s.

(3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Ecology et Systématique,* Institut National de la Recherche Agronomique, 671 s.

(4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.,* vol. 96, 1949, s. 99.

(5) Commission of the European Communities, *Development of* a *standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms,* Report EUR 8714 EN, 1983.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt fur Land-and Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in kunstlichem Boden“, in: Rudolph/Boje, *Ókotoxikologie,* ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Dodatok

Chov a udržiavanie dážďoviek pred testom

Na chov dážďoviek sa používa chovná nádoba s čerstvým substrátom, do ktorej sa na 14 dní umiestni 30 až 50 dospelých jedincov. Tieto jedince sa potom môžu použiť na ďalšie chovné sady. Dážďovky vyliahnuté z kokónov sa po dosiahnutí dospelosti používajú na testovanie (pri uvedených podmienkach je to po 2 až 3 mesiacoch).

Podmienky udržiavania a chovu

Klimatizovaná miestnosť:	teplota 20 ± 2 °C, prednostne s kontinuálnym osvetlením (intenzita 400 až 800 luxov),
Chovné nádoby:	primerané plytké nádoby s objemom 10 až 20 litrov.
Substrát:	*Eisenia foetida* sa môže pestovať v rôznych živočíšnych exkrementoch. Ako chovné médium sa doporučuje zmes 50 % rašeliny a 50 % kravského alebo konského hnoja. Médium by malo mať pH približne 6 až 7 (regulované prídavkom uhličitanu vápenatého) a nízku iónovú vodivosť (menej ako 6 mmhos alebo 0,5 % solí). Substrát by mal byť vlhký, ale nie príliš mokrý. Okrem vyššie uvedenej metódy sa môžu použiť aj iné úspešné postupy.

Poznámka: *Eisenia foetida* sa vyskytuje v dvoch líniách, ktoré niektorí taxonomisti rozdelili do druhov (Bouche, 1972). Sú morfologicky podobné, ale *Eisenia foetida foetida* má typické priečne prúžkovanie na článkoch a *Eisenia foetida andrei* nemá uvedené prúžkovanie a má nepravidelné načervenalé zafarbenie. Podľa možnosti je vhodné použiť dážďovky *Eisenia foetida andrei.* Ak je k dispozícii potrebná metodika, môžu byť použité aj iné druhy.

▼B

C.9. **BIODEGRADÁCIA**

ZAHN-WELLENSOV TEST

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Účelom tejto metódy je hodnotenie potenciálnej konečnej biodegradovateľnosti vo vode rozpustných, neprchavých organických látok v stacionárnom teste pri vystavení vysokým koncentráciám mikroorganizmov.

Môže sa vyskytnúť fyzikálno-chemická adsorbcia na suspendované pevné látky, a preto ju treba brať do úvahy pri interpretácii výsledkov (pozri 3.2).

Študované látky sa používajú v koncentráciách zodpovedajúcich hodnotám DOC v rozmedzí 50 až 400 mg/liter alebo hodnotám COD v rozmedzí 100 až 1 000 mg/liter [DOC = dissolved organic carbon (rozpustený organický uhlík); COD = chemical oxygen demand (chemická spotreba kyslíka)]. Takéto relatívne vysoké koncentrácie majú výhodu analytickej spoľahlivosti. Zlúčeniny s toxickými vlastnosťami môžu oddialiť alebo inhibovať degradačný proces.

V tejto metóde sa na zistenie biodegradovateľnosti testovanej látky využíva meranie rozpusteného organického uhlíka a chemická spotreba kyslíka.

Súčasné použitie špecifickej analytickej metódy môže umožniť zhodnotenie primárnej biodegradácie látky (odstránenie pôvodnej chemickej štruktúry).

Metóda je aplikovateľná len na tie testované organické látky, ktoré pri koncentráciách použitých v teste vykazujú nasledujúce vlastnosti:

— sú pri testovacích podmienkach rozpustné vo vode,

— pri testovacích podmienkach majú zanedbateľný tlak pár,

— nepôsobia inhibične na baktérie,

— v testovacom systéme sú adsorbované len v limitovanom množstve,

— z testovacieho roztoku sa nestrácajú penením.

Informácia o relatívnom pomere hlavných zložiek testovaného materiálu sa použije pri interpretácii získaných výsledkov, obzvlášť v prípadoch, kde sú výsledky slabé alebo okrajové.

Informácia o toxicite látky na mikroorganizmy je žiaduca pri interpretácii slabých výsledkov a pri výbere vhodných testovacích koncentrácií.

▼B

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Stupeň biodegradácie dosiahnutý na konci testu sa udáva ako „Biodegradovateľnosť v Zahn-Wellensovom teste“:

$$D_T\ (\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

kde:

DT = biodegradácia (%) v čase T,

CA = DOC (alebo COD) hodnota v testovanej zmesi meraná 3 hodiny po začatí testu (mg/l) (DOC = rozpustený organický uhlík, COD = chemická spotreba kyslíka),

CT = DOC alebo COD hodnota testovanej zmesi v čase odberu vzorky (mg/l),

CB = DOC alebo COD hodnota slepého pokusu v čase odberu vzorky (mg/l),

CBA = DOC alebo COD hodnota slepého pokusu meraná 3 hodiny po začatí testu (mg/l).

Rozsah degradácie sa zaokrúhľuje na najbližšie celé percento.

Percentuálna degradácia sa stanovuje ako percento úbytku DOC (alebo COD) z testovanej látky.

Rozdiely medzi hodnotami nameranými po 3 hodinách od začatia testu a prepočítanými alebo prednostne nameranými počiatočnými hodnotami poskytujú vhodnú informáciu o eliminácii látky (pozri 3.2, Interpretácia výsledkov).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

V prípade skúmania novej testovanej látky je vhodné použiť referenčnú látku, avšak špecifickú referenčnú látku nie je zatiaľ možné odporučiť.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Aktivovaný kal, minerálne živiny a testovaný materiál ako jediný zdroj uhlíka vo vodnom roztoku sú spolu umiestnené do sklenenej nádoby s objemom 1 až 4 litre vybavenej miešadlom a prevzdušňovačom. Zmes sa premiešava a prevzdušňuje pri teplote 20 až 25 °C pod difúznym osvetlením alebo v tme po dobu 28 dní. Proces degradácie sa monitoruje vo filtrovanom roztoku stanovovaním hodnoty DOC (alebo COD) denne alebo v iných pravidelných časových intervaloch. Pomer eliminovaných DOC (alebo COD) v každom časovom intervale k hodnote získanej po 3 hodinách od začiatku testu sa vyjadruje ako percento biodegradácie a slúži na meranie rozsahu degradácie v danom čase. Výsledok je znázornený v biodegradačnej krivke v závislosti od času.

Pri použití špecifickej analytickej metódy sa môže merať zmena koncentrácie pôvodnej molekuly v dôsledku biodegradácie (primárna biodegradovateľnosť).

▼B

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Dostatočná reprodukovateľnosť tohto testu bola potvrdená kruhovým testom.

Citlivosť metódy je do značnej miery určená variabilitou slepej vzorky a v menšej miere presnosťou stanovenia hodnoty DOC a hladiny testovanej zlúčeniny v médiu.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. *Príprava*

1.6.1.1. Reagenčné látky

Testovacia voda: pitná voda s obsahom organického uhlíka menej ako < 5 mg/liter. Koncentrácia iónov vápnika a horčíka nesmie spolu presiahnuť 2,7 mmol/liter; v opačnom prípade sa požaduje riedenie s deionizovanou alebo destilovanou vodou.

Kyselina sírová, analytickej čistoty (p.a.):	50 g/l
Roztok hydroxidu sodného (p.a.):	40 g/l
Roztok minerálnych živín: rozpustiť v 1 litri deionizovanej vody:	
chlorid amónny, NH_4Cl, (p.a.):	38,5 g
dihydrogénfosforečnan sodný, $NaH_2PO_4.2H_2O$, (p.a.):	33,4 g,
dihydrogénfosforečnan draselný, KH_2PO_4, (p.a):	8,5 g,
hydrogénfosforečnan draselný, K_2HPO_4, (p.a.):	21,75 g.

Zmes slúži jednak ako zdroj živín aj ako tlmivý roztok.

1.6.1.2. Prístroje

Sklenené nádoby s objemom 1 až 4 litre (napr. cylindrické nádoby).

Miešadlo so skleneným alebo kovovým rotorom na vhodnom pieste (miešadlo by malo rotovať približne 5 až 10 cm nad dnom nádoby). Namiesto takéhoto miešadla môže byť použitý aj magnetický rotor s miešadlom dlhým 7 až 10 cm.

Sklená trubka s vnútorným priemerom 2 až 4 mm na vháňanie vzduchu. Koniec trubky s otvorom by mal byť približne 1 cm nad dnom nádoby.

Centrifúga (približne 3 550 g).

pH meter.

Prístroj na meranie rozpusteného kyslíka.

Papierové filtre.

▼B

Membránová filtračná aparatúra.

Membránové filtre s pórmi o veľkosti 0,45 μm. Vhodné sú membránové filtre, ktoré neumožňujú únik uhlíka ani absorpciu látky počas filtrácie.

Analytické zariadenie na stanovenie obsahu organického uhlíka a chemickej spotreby kyslíka.

1.6.1.3. Príprava inokula

Aktivovaný kal z biologickej čističky sa premýva (opakovanou) centrifugáciou alebo sedimentovaním s testovacou vodou.

Aktivovaný kal musí byť vo vhodnom stave. Takýto kal je dostupný zo správne pracujúcej čističky odpadových vôd. Aby sa získal čo najväčší počet rôznych druhov bakteriálnych kmeňov, uprednostňuje sa zmiešať inokulá z rôznych zdrojov (napr. rôzne čističky, pôdne extrakty, riečne vody a pod.). Zmes sa spracováva podľa vyššie uvedeného postupu.

Na kontrolu aktivity aktivovaného kalu pozri nižšie „Funkčná kontrola“.

1.6.1.4. Príprava testovacích roztokov

Do testovacej nádoby sa pridá 500 ml testovacej vody, 2,5 ml/liter roztoku minerálnych živín a aktivovaný kal v množstve zodpovedajúcom 0,2 až 1,0 g/liter sušiny v celkovom objeme. Následne sa pridá také množstvo zásobného roztoku testovanej látky, aby výsledná koncentrácia DOC v celkovej zmesi bola 50 až 400 mg/liter. Zodpovedajúce hodnoty COD sú 100 až 1 000 mg/liter. Doplní sa testovacou vodou do celkového objemu 1 ž 4 litre. Voľba celkového objemu závisí od počtu vzoriek, u ktorých stanovujeme DOC alebo COD a od objemu nevyhnutného na analytické postupy.

Bežne môžeme považovať objem 2 litre za dostačujúci. Paralelne s každou testovanou skupinou sa spúšťa kontrolná nádoba (slepý test); obsahuje iba aktivovaný kal a roztok minerálnych živín zarobený s testovacou vodou do celkového objemu rovnakého ako v testovanej skupine.

1.6.2. *Vykonanie testu*

Testovacie nádoby sú premiešavané magnetickými miešadlami alebo skrutkovitou vrtuľou pri difúznom osvetlení alebo v tmavej miestnosti pri teplote 20 až 25 ^{o}C. Prevzdušňovanie sa vykonáva stlačeným vzduchom, ktorý je, ak je to nevyhnutné, prečistený cez bavlneno-vlnené sitko a premývaciu fľašu. Musí byť zaručené, že kal sa neusadí a koncentrácia kyslíka nepoklesne pod 2 mg/liter.

Hodnota pH sa musí kontrolovať v pravidelných intervaloch (napr. denne), a ak je to nevyhnutné, upravuje sa na pH 7 – 8.

▼B

Straty spôsobené vyparovaním sa dopĺňajú deionizovanou alebo destilovanou vodou v požadovaných množstvách tesne pred každým odberom vzorky. Vhodným krokom je zaznačiť si hladinu kvapaliny v nádobe pre začatím testu. Po každom odbere vzoriek sa robia nové značky (bez miešania a prevzdušňovania). Prvé vzorky sa vždy odoberajú 3 hodiny po začatí testu, aby sa určila adsorpcia testovaného materiálu aktivovaným kalom.

Následne po eliminácii testovaného materiálu sa denne alebo v iných pravidelných časových intervaloch stanovujú hodnoty DOC alebo COD. Vzorky z testovacích nádob a zo slepého pokusu sa prefiltrujú cez dôkladne premytý papierový filter. Prvých 5 ml testovacieho roztoku sa odstráni. Kal, ktorý sa ťažko filtruje, sa môže ešte predtým odstrániť centrifugáciou 10 minút. DOC a COD hodnoty sa stanovujú duplicitne. Test prebieha 28 dní.

Poznámka: Vzorky, ktoré zostávajú zakalené, sa filtrujú cez membránové filtre. Membránové filtre nesmú prepúšťať alebo adsorbovať žiadny organický materiál.

Kontrola funkčnosti aktivovaného kalu

Na kontrolu funkčnej kapacity aktivovaného kalu beží paralelne s každou testovanou sériou nádoba obsahujúca známu látku. Na tento účel sa najčastejšie využíva dietylénglykol.

Adaptácia

Ak sa analýzy uskutočňujú v relatívne krátkych časových intervaloch (napr. denne), môžeme z degradačnej krivky jasne pozorovať adaptáciu (pozri obrázok 2). Test by preto nemal začínať tesne pred víkendom.

Ak je adaptácia pozorovaná na konci periódy, test môže byť predĺžený, až kým nie je degradácia ukončená.

Poznámka: V prípade, že sú potrebné širšie poznatky o správaní sa adaptovaného kalu, aktivovaný kal je opätovne vystavený rovnakému testovanému materiálu podľa nasledujúceho postupu:

Vypne sa miešadlo a prevzdušňovač a nechá sa usadiť aktivovaný kal. Odčerpá sa supernatant a nádoba sa naplní opäť 2 litrami testovacej vody. Mieša sa 15 minút a znovu sa nechá usadiť. Po opätovnom odčerpaní supernatantu sa zvyšný kal použije na opakovanie testu s tým istým testovaným materiálom podľa 1.6.1.4 a 1.6.2. Aktivovaný kal možno izolovať okrem usadzovania aj centrifugáciou.

Adaptovaný kal sa môže zmiešať s čerstvým kalom do koncentrácie 0,2 až 1 g sušiny/liter.

▼B

Analytické prostriedky

Bežne sa vzorky filtrujú cez dôkladne premyté papierové filtre (na premývanie sa používa deionizovaná voda).

Vzorky, ktoré zostávajú zakalené, sa filtrujú cez membránové filtre (0,45 um).

Hodnoty DOC sa vo filtrátoch zo vzoriek stanovujú duplicitne (prvých 5 ml sa odstráni) prostredníctvom TOC zariadenia. Ak filtrát nie je možné analyzovať v ten istý deň, musí sa uskladňovať v chladničke do ďalšieho dňa. Dlhšie skladovanie sa neodporúča.

Koncentrácie COD sa stanovujú vo filtrátoch zo vzoriek COD analýzou postupom uvedeným v literatúre pod bodom (2).

2. **ÚDAJE A HODNOTENIE**

DOC a/alebo COD koncentrácie sa stanovujú zo vzorky najmenej duplicitne podľa uvedeného odseku 1.6.2. Degradácia v čase T sa prepočíta podľa vzorca (s definíciami) uvedeného v odseku 1.2.

Miera degradácie sa zaokrúhľuje na najbližšie celé percento. Množstvo degradácie dosiahnuté na konci testu sa vyjadruje ako „Biodegradovateľnosť v Zahn -Wellensovom teste“.

Poznámka: Ak sa dosiahne úplná degradácia ešte pred koncom testu a tento výsledok sa potvrdí aj druhou analýzou nasledujúci deň, test môže byť uzavretý.

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu obsahuje podľa možnosti nasledujúce informácie:

— počiatočnú koncentráciu testovanej látky,

— všetky ostatné informácie a výsledky experimentov týkajúcich sa testovanej látky, referenčnej látky, ak bola použitá, a slepého pokusu,

— koncentráciu po 3 hodinách,

— biodegradačnú krivku s opisom,

— dátum a miesto, odkiaľ boli testovacie organizmy odobraté, stav adaptácie, použité koncentrácie a pod.,

— vedecké zdôvodnenie akejkoľvek zmeny testovacieho procesu.

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Úbytok DOC (COD), ktorý sa vyskytuje postupne v priebehu dní alebo týždňov, naznačuje, že látka je biodegradovaná.

▼B

V niektorých prípadoch však môže hrať úlohu fyzikálno-chemická adsorpcia a táto je indikovaná, ak sa vyskytne úplný alebo čiastočný úbytok do prvých troch hodín od začiatku testu a ak rozdiel medzi kontrolným a testovaným supernatantom zostáva na nečakane nízkej úrovni.

Ak rozdiely spadajú medzi biodegradáciu (alebo parciálnu biodegradáciu) a adsorpciu, sú nevyhnutné ďalšie testy.

Toto sa môže uskutočniť rôznymi spôsobmi, ale najpresvedčivejšie je použitie supernatantu alebo kalu ako inokula v základnom teste (prednostne respirometrický test).

Testovaná látka, ktorá vykazuje vysoký, neadsorpčný úbytok DOC (COD) v tomto teste, sa môže považovať za potenciálne biodegradovateľnú. Čiastočný, neadsorpčný úbytok naznačuje, že látka je predmetom aspoň čiastkovej biodegradácie. Nízky alebo nulový úbytok DOC (COD) môže byť zapríčinený inhibíciou mikroorganizmov testovanou látkou, čo možno tiež spozorovať lýzou alebo stratou kalu za vzniku kalných supernatantov. Test treba v týchto prípadoch zopakovať použitím nižších koncentrácií testovanej látky.

Použitie zložkovo špecifickej analytickej metódy alebo 14C-značenej testovanej látky môže zabezpečiť vyššiu citlivosť. V prípade použitia 14C-značenej testovanej zložky potvrdzuje prítomnosť biodegradácie objavenie $14CO_2$.

Ak sa výsledky uvádzajú vo forme primárnej biodegradácie, treba podľa možnosti priložiť vysvetlenie zmeny chemickej štruktúry, ktorá vedie k strate reakcie pôvodnej testovanej látky.

Platnosť analytickej metódy sa musí uviesť spolu s reakciou zistenou v testovacom médiu v slepom pokuse.

4. **LITERATÚRA**

(1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 B,* Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC (OJ L 251, 19.9.1984, p. 1).

▼B

Dodatok

PRÍKLAD VYHODNOTENIA

Organická zložka:	kyselina 4-etoxybenzoová
Teoretická testovaná koncentrácia:	600 mg/l
Teoretická hodnota DOC:	390 mg/l
Inokulum:	čistička odpadových vôd z ...
Koncentrácia:	1 g sušiny/liter
Stav adaptácie:	neadaptovaný
Analýza:	stanovenie DOC
Množstvo vzorky:	3ml
Kontrolná látka:	dietylénglykol
Toxicita zložky:	žiadny toxický efekt pod 1 000 mg/l Použitý test: Skúmavkový test fermentácie tabuľka

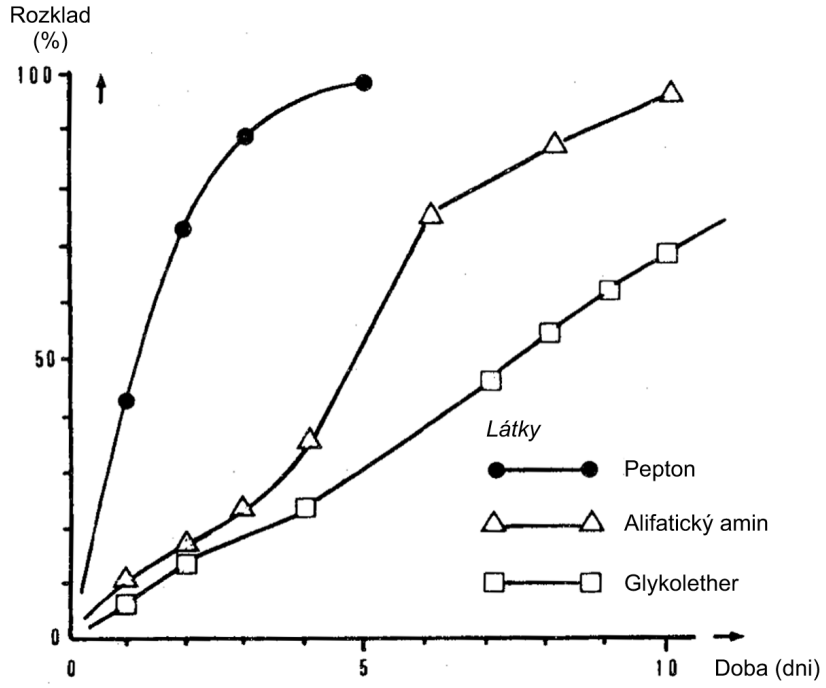
Doba testu	Kontrolná látka				Testovaná látka		
	Slepý pokus DOC ([1]) (mg/liter)	DOC ([1]) (mg/liter)	DOC Čistý (mg/liter)	% degradáde	DOC ([1]) (mg/liter)	DOC Čistý (mg/liter	% degradáde
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 hodiny	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,2	6
1 deň	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dni	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dní	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dní	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dní	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dní	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dní	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dní	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

([1]) Stredná hodnota troch stanovení DOC.

▼B

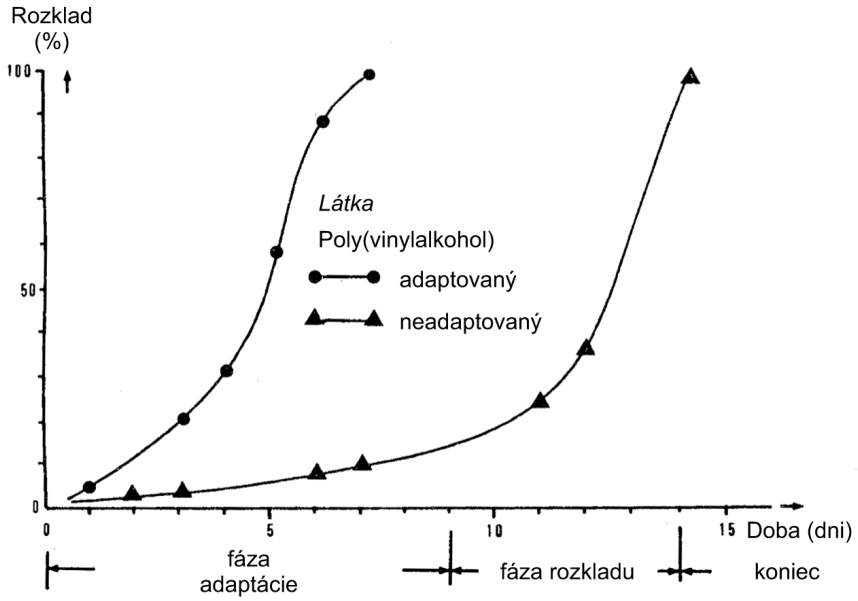
Obrázok č. 1

Príklady biodegradačných kriviek



Obrázok č. 2

Príklady adaptácie kalu



▼M4

C.10. **SIMULAČNÝ TEST AERÓBNEHO ČISTENIA ODPADOVÝCH VÔD C.10-A: JEDNOTKY S TECHNOLÓGIOU AKTIVOVANÉHO KALU – C.10-B: BIOFILMY**

C.10-A: Jednotky s technológiou aktivovaného kalu

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov (TG) 303 (2001). V 50. rokoch 20. storočia sa zistilo, že novozavedené povrchovo aktívne činidlá spôsobujú v čistiarňach odpadových vôd a v riekach nadmerné penenie. Aeróbnym čistením sa neodstránili úplne a v niektorých prípadoch bránili odstráneniu iných organických materiálov. Tento problém podnietil mnohé výskumy zaoberajúce sa otázkou, ako možno z odpadových vôd odstrániť povrchovo aktívne činidlá a či možno nové chemikálie, ktoré priemysel produkuje, prispôsobiť čisteniu odpadových vôd. Na tento účel sa použili modelové jednotky dvoch hlavných druhov aeróbneho biologického čistenia odpadových vôd (aktivovaný kal a filtrácia perkoláciou alebo prekvapkávaním). Bolo by nepraktické a finančne veľmi náročné distribuovať každú novú chemikáliu a monitorovať veľké čistiarne odpadových vôd, aj keby to bolo len na lokálnej úrovni.

ÚVODNÉ ÚVAHY

Jednotky s technológiou aktivovaného kalu

2. Modelové jednotky s technológiou aktivovaného kalu sú opísané v rozmedzí veľkosti od 300 ml približne do 2 000 ml. Niektoré jednotky v mnohom pripomínali skutočné čistiarne tým, že mali nádrže na usadzovanie kalu, z ktorých sa usadený kal prečerpával späť do prevzdušňovacej nádrže, zatiaľ čo iné jednotky nemali vybavenie na usadzovanie, napr. Swisher (1). Veľkosť zariadenia je výsledkom kompromisu. Na jednej strane musí byť dostatočne veľké na zabezpečenie funkčnej mechanickej prevádzky a dostatočného množstva vzoriek bez toho, aby to ovplyvnilo prevádzku, a na druhej strane by nemalo byť také veľké, aby vyžadovalo nadmerný priestor a materiál.

3. Dvomi druhmi zariadenia s rozsiahlym a vyhovujúcim použitím sú jednotky Husmann (2) a jednotky s pórovitou nádobou (3) (4), ktoré sa prvýkrát použili vo výskume povrchovo aktívnych činidiel. Tieto zariadenia sú opísané v tejto testovacej metóde. Uspokojivé využitie mali aj iné zariadenia, napr. Eckenfelder (5). Vzhľadom na pomerne vysokú finančnú náročnosť a úsilie pri aplikovaní tohto simulačného testu boli súbežne skúmané jednoduchšie a lacnejšie skríningové testy, ktoré sú teraz začlenené do kapitoly C.4 A – F tejto prílohy (6). Zo skúseností s mnohými povrchovo aktívnymi činidlami a inými chemikáliami vyplynulo, že tie, ktoré prešli skríningovými testmi (ľahko biodegradovateľné), sa rozložili aj v simulačnom teste. Niektoré chemikálie, ktoré neprešli skríningovými testmi, prešli testmi inherentnej biodegradovateľnosti [kapitoly C.12 (7) a C.19 (8) tejto prílohy], ale iba niektoré z nich sa rozložili v simulačnom teste, zatiaľ čo chemikálie, ktoré neprešli testmi inherentnej biodegradovateľnosti, sa v simulačných testoch nerozložili (9) (10) (11).

4. Na niektoré účely postačujú simulačné testy uskutočnené s využitím jedného súboru prevádzkových podmienok. Výsledky sú vyjadrené ako percentuálna eliminácia testovanej chemikálie alebo rozpusteného organického uhlíka (DOC). Opis takéhoto testu je uvedený v tejto testovacej metóde. Na rozdiel od predchádzajúcej verzie tejto kapitoly, v ktorej bol opísaný iba jeden druh zariadenia na čistenie syntetických médií cez spojenie s využitím pomerne hrubej metódy odstraňovania kalu, tento text

▼M4

ponúka viacero možností. Sú tu opísané alternatívne druhy zariadení, prevádzkové režimy a spôsoby odstraňovania odpadovej vody a kalu. Tento text je v súlade s normou ISO 11733 (12), ktorá bola počas prípravy predmetom dôkladnej kontroly, aj keď nebola podrobená kruhovému testu.

5. Na iné účely je nevyhnutné poznať koncentráciu testovanej chemikálie vo výtoku s väčšou presnosťou, a je teda potrebná rozsiahlejšia metóda. Napríklad rýchlosť odstraňovania kalu sa musí presnejšie kontrolovať počas každého dňa a počas trvania testu a čistiarne musia fungovať pri niekoľkých rýchlostiach odstraňovania. V rámci plne komplexnej metódy by testy takisto mali prebiehať pri dvoch alebo troch rôznych teplotách: takúto metódu opisuje Birch (13) (14) a je zhrnutá v dodatku 6. Súčasné znalosti však nepostačujú na rozhodnutie o tom, ktoré kinetické modely sú použiteľné na biodegradáciu chemikálií pri čistení odpadových vôd a vo vodnom prostredí všeobecne. Použitie Monodovej kinetiky, uvedené v dodatku 6 ako príklad, je obmedzené na chemikálie prítomné v koncentrácii 1 mg/l a viac, ale podľa niektorých názorov aj to ešte treba podložiť dôkazmi. Testy pri koncentráciách, ktoré reálnejšie odrážajú hodnoty namerané v odpadových vodách, sa uvádzajú v dodatku 7, ale tieto testy spolu s testami v dodatku 6 sú zahrnuté do dodatkov a nie sú publikované ako samostatné testovacie metódy.

Filtre

6. Modelom perkolačných filtrov bola venovaná oveľa menšia pozornosť možno preto, lebo sú ťažšie ovládateľné a menej kompaktné ako modely jednotiek s technológiou aktivovaného kalu. Gerike a kol. vyvinul jednotky s technológiou prekvapkávacích filtrov a prevádzkoval ich s využitím spojenia (15). Tieto filtre boli pomerne veľké (výška 2 m, objem 60 l) a každý vyžadoval 2 l/h odpadovej vody. Baumann a kol. (16) simuloval prekvapkávacie filtre tak, že vložil polyesterové vlnené pásy do trubíc dlhých 1 m (vnútorný priemer 14 mm) po tom, ako boli pásy na 30 minút ponorené do koncentrovaného aktivovaného kalu. Testovaná chemikália ako jediný zdroj C v roztoku minerálnych solí bola napustená vertikálnou trubicou a biodegradácia sa vyhodnotila na základe meraní DOC vo výtoku a CO_2 vo vychádzajúcom plyne.

7. Biofiltre boli simulované inak (15). Vnútorné povrchy rotujúcich trubíc, ktoré boli pod malým uhlom naklonené k horizontálnym, boli napustené odpadovou vodou (približne 250 ml/h) s testovanou chemikáliou a bez nej, pričom v odobraných výtokoch sa analyzovala prítomnosť DOC a/alebo konkrétnej testovanej chemikálie.

PRINCÍP TESTU

8. Táto metóda bola vypracovaná s cieľom stanoviť elimináciu a primárnu a/alebo úplnú biodegradáciu organických chemikálií rozpustných vo vode pomocou aeróbnych mikroorganizmov v testovacom systéme s nepretržitou prevádzkou, ktorý simuluje proces aktivovaného kalu. Ľahko biodegradovateľné organické médium a organická testovaná chemikália sú pre mikroorganizmy zdrojom uhlíka a energie.

9. Dve testovacie jednotky s nepretržitou prevádzkou (čistiarne s technológiou aktivovaného kalu alebo pórovité nádoby) sú v prevádzke súbežne za rovnakých podmienok, ktoré sa vyberú tak, aby vyhovovali účelu testu. Priemerný hydraulický retenčný čas je zvyčajne 6 h a priemerný vek kalu (retenčný čas kalu) je šesť až desať dní. Kal sa odstraňuje jednou alebo dvoma metódami, testovaná chemikália sa zvyčajne pridá v koncentrácii medzi 10 mg/l rozpusteného organického uhlíka (DOC) a 20 mg/l DOC do prítoku (organické médium) iba jednej z jednotiek. Druhá jednotka sa použije ako kontrolná jednotka s cieľom stanoviť biodegradáciu organického média.

▼M4

10. V často odoberaných vzorkách výtokov sa špecifickou analýzou podľa možnosti určí DOC alebo chemická spotreba kyslíka (COD) spolu s koncentráciou testovanej chemikálie (ak sa požaduje) vo výtoku z jednotky, do ktorej sa pridáva testovaná chemikália. Predpokladá sa, že rozdiel medzi koncentráciami DOC alebo COD vo výtoku medzi testovacími a kontrolnými jednotkami vzniká v dôsledku testovanej chemikálie alebo jej organických metabolitov. Tento rozdiel sa porovná s koncentráciou DOC alebo COD v prítoku v dôsledku pridanej testovanej chemikálie s cieľom určiť elimináciu testovanej chemikálie.

11. Biodegradáciu je možné zvyčajne odlíšiť od bioadsorpcie tak, že sa dôkladne preskúma krivka závislosti eliminácie chemikálie od času, a zvyčajne ju možno potvrdiť pomocou testu ľahkej biodegradovateľnosti s použitím aklimatizovaného inokula z jednotky, do ktorej sa pridáva testovaná chemikália.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

12. Je potrebné poznať čistotu, rozpustnosť vo vode, prchavosť a adsorpčné vlastnosti testovanej chemikálie, aby bolo možné správne interpretovať výsledky. Prchavé a nerozpustné chemikálie sa zvyčajne nemôžu testovať, pokiaľ sa neprijmú zvláštne opatrenia (pozri dodatok 5). Je nutné poznať aj chemickú štruktúru alebo aspoň empirický vzorec, aby bolo možné vypočítať teoretické hodnoty a/alebo skontrolovať namerané hodnoty parametrov, napr. teoretická spotreba kyslíka (ThOD), rozpustený organický uhlík (DOC) a chemická spotreba kyslíka (COD).

13. Informácie týkajúce sa toxicity testovanej chemikálie pre mikroorganizmy (pozri dodatok 4) môžu byť užitočné pri výbere vhodných testovaných koncentrácií a môžu byť nevyhnutné pre správnu interpretáciu nízkych hodnôt biodegradácie.

ÚROVNE ÚSPEŠNOSTI

14. Pri pôvodnom použití tohto simulačného (potvrdzujúceho) testu primárnej biodegradácie povrchovo aktívnych činidiel sa požaduje odstránenie viac ako 80 % špecifickej chemikálie pred tým, ako sa povrchovo aktívne činidlo môže uviesť na trh. Ak sa nedosiahne hodnota 80 %, môže sa použiť tento simulačný (potvrdzujúci) test a povrchovo aktívne činidlo možno uviesť na trh, iba ak sa odstráni viac ako 90 % špecifickej chemikálie. Pri chemikáliách vo všeobecnosti nevzniká otázka úspešného/neúspešného hodnotenia v teste a získaná hodnota percentuálnej eliminácie sa môže použiť v približných výpočtoch pravdepodobnej koncentrácie v životnom prostredí, ktoré sa použijú v hodnotení rizika predstavovaného chemikáliami. Výsledky sa zvyčajne riadia schémou „všetko alebo nič“. V mnohých štúdiách čistých chemikálií sa zistilo, že percentuálna eliminácia DOC je > 90 % v prípade viac ako troch štvrtín chemikálií a > 80 % pri vyše 90 % chemikálií, ktoré vykazovali významný stupeň biodegradovateľnosti.

15. V odpadových vodách je prítomných pomerne málo chemikálií (napr. povrchovo aktívnych činidiel) v koncentráciách (približne 10 mg C/l) použitých v tomto teste. Niektoré chemikálie môžu mať pri týchto koncentráciách inhibičný účinok, zatiaľ čo kinetika eliminácie iných chemikálií sa pri nízkych koncentráciách môže líšiť. Presnejšie hodnotenie degradácie možno uskutočniť prostredníctvom upravených metód s využitím realisticky nízkych koncentrácií testovanej chemikálie a zozbierané údaje možno použiť na výpočet kinetických konštánt. Potrebné experimentálne postupy však ešte nie sú celkom overené a nie sú stanovené ani kinetické modely, ktoré opisujú biodegradačné reakcie (pozri dodatok 7).

▼M4

REFERENČNÉ CHEMIKÁLIE

16. S cieľom zabezpečiť správne vykonanie experimentálneho postupu je užitočné súbežne so skúmaním testovaných chemikálií príležitostne testovať aj chemikálie, ktorých správanie je známe. Medzi také chemikálie patrí kyselina adipová, 2-fenylfenol, 1-naftol, kyselina 2,2-bifenyldikarboxylová, kyselina 1-naftoová atď. (9) (10) (11).

REPRODUKOVATEĽNOSŤ VÝSLEDKOV TESTU

17. Existuje podstatne menej správ o štúdiách simulačných testov ako správ o štúdiách testov ľahkej biodegradovateľnosti. Reprodukovateľnosť medzi (súbežnými) opakovaniami testu je dobrá (v rozsahu 10 – 15 %) v prípade testovaných chemikálií rozložených na 80 % alebo viac, ale v prípade horšie rozložiteľných chemikálií je variabilita väčšia. Pri niektorých hraničných chemikáliách boli takisto pri rôznych príležitostiach počas deviatich týždňov povolených v teste zaznamenané veľmi rôznorodé výsledky (napr. 10 %, 90 %).

18. Medzi výsledkami získanými pomocou dvoch druhov zariadení boli zistené malé rozdiely, ale niektoré chemikálie sa rozložili vo väčšej miere a konzistentnejšie v prítomnosti domácich splaškových vôd ako v syntetických médiách OECD.

OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Zariadenie

Testovací systém

19. Testovací systém pre jednu testovanú chemikáliu pozostáva z testovacej jednotky a z kontrolnej jednotky. Ak sa však vykonávajú iba špecifické analýzy (primárna biodegradácia), vyžaduje sa len testovacia jednotka. Jedna kontrolná jednotka sa môže použiť pre viaceré testovacie jednotky, do ktorých sa pridávajú rovnaké alebo rôzne testované chemikálie. V prípade spájania (dodatok 3) musí mať každá testovacia jednotka svoju vlastnú kontrolnú jednotku. Testovacím systémom môže byť buď model čistiarne s technológiou aktivovaného kalu, jednotka Husmann (dodatok 1, obrázok 1), alebo pórovitá nádoba (dodatok 1, obrázok 2). V oboch prípadoch sú potrebné dostatočne veľké zásobné nádoby pre prítoky a výtoky, ako aj pumpy na dávkovanie prítoku buď zmiešaného s roztokom testovanej chemikálie, alebo dodaného samostatne.

20. Každá jednotka čistiarne s technológiou aktivovaného kalu sa skladá z prevzdušňovacej nádoby so známou kapacitou približne tri litre aktivovaného kalu a separátora (sekundárny čerič), ktorý pojme približne 1,5 litra. Objemy možno do určitej miery meniť nastavením výšky separátora. Nádoby rôznych veľkostí sú prípustné, ak sa prevádzkujú pri porovnateľných hydraulických záťažiach. Ak nie je možné udržať teplotu v testovacej miestnosti v želanom rozsahu, odporúča sa použiť nádoby s vodným plášťom s kontrolou teploty vody. Na nepretržitú alebo v pravidelných intervaloch prerušovanú recykláciu aktivovaného kalu zo separátora do prevzdušňovacej nádoby sa používa vzduchové alebo dávkovacie čerpadlo.

21. Systém pórovitej nádoby sa skladá z vnútorného pórovitého valca s kónickým dnom umiestneného v o niečo väčšej nádobe rovnakého tvaru, ktorá je však vyrobená z nepriepustného plastového materiálu. Vhodným materiálom pre pórovitú nádobu je pórovitý polyetylén s maximálnou veľkosťou pórov 90 μm a s hrúbkou 2 mm. Separácia kalu z ošetreného organického média sa uskutočňuje diferenciálnym prechodom cez pórovitú stenu. Výtok sa zhromažďuje v prstencovom priestore, odkiaľ preteká do zbernej nádoby. Nedochádza k usadzovaniu, a teda ani k obnove kalu. Celý systém môže byť upevnený vo vodnou kúpeli s termostatickou kontrolou. Pórovité nádoby sa

▼M4

môžu upchať a pretekať do počiatočných fáz. V takom prípade je potrebné vymeniť pórovitú vložku za čistú tak, že sa odčerpá kal z nádoby do čistého vedra a odstráni sa upchatá vložka. Po očistení nepriepustného vonkajšieho valca sa vloží čistá vložka a kal sa vráti späť do nádoby. Všetok kal, ktorý sa zachytil po stranách upchatej vložky, sa takisto dôkladne zotrie a prenesie. Upchaté nádoby sa najskôr vyčistia jemným prúdom vody, ktorým sa odstráni zostávajúci kal, a namočia do zriedeného roztoku chlórnanu sodného, potom do vody a následne sa dôkladne opláchnu vodou.

22. Na prevzdušňovanie kalu v prevzdušňovacích nádobách obidvoch systémov sú nevyhnutné vhodné metódy, napríklad sintrované frity (difúzne kamene) a stlačený vzduch. V prípade potreby sa musí vzduch čistiť cez vhodný filter a premývať. Do systému sa musí vháňať dostatok vzduchu s cieľom zachovať aeróbne podmienky a udržať vločky kalu v suspenznom stave počas celého trvania testu.

Filtračné zariadenie alebo odstredivka

23. Prístroj na filtráciu vzoriek s membránovými filtrami vhodnej pórovitosti (nominálny priemer otvoru 0,45 μm), ktoré adsorbujú rozpustné organické chemikálie a uvoľňujú organický uhlík v minimálnej miere. Ak sa použijú filtre, ktoré uvoľňujú organický uhlík, je potrebné dôkladne umyť filtre horúcou vodou, aby sa odstránil vylúhovateľný organický uhlík. Prípadne sa môže použiť odstredivka schopná dosiahnuť 40 000 m/s^2.

Analytické zariadenie

24. Prístroj schopný určiť:

— DOC (rozpustený organický uhlík) a TOC (celkový organický uhlík) alebo COD (chemická spotreba kyslíka),

— špecifickú chemikáliu v prípade potreby,

— suspendované tuhé látky, pH, koncentráciu kyslíka vo vode,

— teplotu, kyslosť a zásaditosť,

— amónium, dusitan a dusičnan, ak sa test vykonáva v nitrifikačných podmienkach.

Voda

25. Voda z vodovodu s obsahom DOC nižším ako 3 mg/l. Určí sa zásaditosť, ak ešte nie je známa.

26. Deionizovaná voda s obsahom DOC nižším ako 2 mg/l.

Organické médium

27. Ako organické médium sú prípustné syntetické médiá, domáce splaškové vody alebo zmes obidvoch. Ukázalo sa (11) (14), že pri použití samotných domácich splaškových vôd často dochádza k zvýšenej percentuálnej eliminácii DOC a dokonca je možná eliminácia a biodegradácia niektorých chemikálií, ktoré nepodliehajú biodegradácii pri použití syntetických médií OECD. Nepretržitým alebo prerušovaným pridávaním domácich splaškových vôd sa takisto často stabilizuje aktivovaný kal vrátane rozhodujúcej schopnosti dobrého usadzovania sa. Preto sa odporúča používať domáce splaškové vody. Meria sa koncentrácia DOC alebo COD v každej novej dávke organického média. Je potrebné poznať kyslosť alebo zásaditosť organického média. Organické médium môže vyžadovať pridanie vhodného tlmivého roztoku (hydrogénuhličitan sodný alebo dihydrogénfosforečnan draselný), ak má nízku kyslosť alebo zásaditosť, aby počas testu v prevzdušňovacej nádobe ostalo zachované pH s hodnotou približne 7,5 ± 0,5. O množstve a čase pridania tlmivého roztoku sa rozhoduje individuálne pre každý prípad. Ak sa používajú zmesi, či už nepretržite alebo prerušovane, DOC (alebo COD) v zmesi sa musí udržiavať na približne stálych hodnotách, napríklad riedením vodou.

▼M4

Syntetické médiá

28. V každom litri vody z vodovodu sa rozpustí: 160 mg peptónu, 110 mg mäsového extraktu, 30 mg močoviny, 28 mg bezvodého hydrogénfosforečnanu draselného (K_2HPO_4), 7 mg chloridu sodného (NaCl), 4 mg dihydrátu chloridu vápenatého ($CaCl_2.2H_2O$), 2 mg heptahydrátu síranu horečnatého ($Mg_2SO_4.7H_20$). Toto syntetické médium OECD je uvedené ako príklad a zabezpečuje strednú koncentráciu DOC v prítoku v hodnote približne 100 mg/l. Môžu sa prípadne použiť iné zloženia s približne rovnakou koncentráciou DOC, ktoré sa viac približujú skutočným splaškovým vodám. Ak je potrebný prítok s nižšou koncentráciou, zriedia sa syntetické médiá napríklad v pomere 1: 1 s vodou z vodovodu, aby sa získala koncentrácia približne 50 mg/l. Takýto slabší prítok umožní lepší rast nitrifikačných organizmov, pričom táto modifikácia by sa mala použiť v prípade skúmania simulácie nitrifikačných čistiarní odpadových vôd. Tieto syntetické médiá sa môžu pripraviť v destilovanej vode v koncentrovanej forme a do jedného týždňa skladovať pri teplote približne 1 °C. V prípade potreby sa zriedia vodou z vodovodu. (Toto médium nie je vyhovujúce, napr. koncentrácia dusíka je veľmi vysoká, pomerne nízky obsah uhlíka, ale nebolo navrhnuté nič lepšie okrem pridania ďalšieho fosfátu ako tlmivého roztoku a ďalšieho peptónu).

Domáce splaškové vody

29. Použijú sa čerstvo usadené splaškové vody zbierané denne z čistiarní odpadových vôd, do ktorých sa dodávajú prevažne domáce splaškové vody. Mali by sa odobrať pred primárnou sedimentáciou z prietokového kanála nádrže primárnej sedimentácie alebo z prívodu do čistiarne s technológiou aktivovaného kalu a mali by byť zbavené hrubých častíc. Splaškové vody sa môžu použiť po niekoľkodňovom uskladnení (ktoré by však vo všeobecnosti nemalo presiahnuť sedem dní) pri teplote približne 4 °C, ak sa preukáže, že DOC (alebo COD) sa výrazne neznížil (t. j. o menej ako 20 %). Na obmedzenie porúch systému je potrebné pred použitím upraviť DOC (alebo COD) každej novej dávky na vhodnú stálu hodnotu, napr. zriedením vodou z vodovodu.

Aktivovaný kal

30. Odoberie sa aktivovaný kal na inokuláciu z prevzdušňovacej nádrže správne prevádzkovanej čistiarne odpadových vôd alebo z laboratórnej jednotky s technológiou aktivovaného kalu spracúvajúcej prevažne domáce splaškové vody.

Zásobné roztoky testovanej chemikálie

31. V prípade chemikálií s dostatočnou rozpustnosťou sa pripravia zásobné roztoky s vhodnými koncentráciami (napr. 1 – 5 g/l) v deionizovanej vode alebo v minerálnej časti syntetických médií (pre nerozpustné a prchavé chemikálie pozri dodatok 5). Určí sa DOC a celkový organický uhlík (TOC) zásobného roztoku a merania sa opakujú pri každej novej dávke. Ak je rozdiel medzi DOC a TOC väčší ako 20 %, je potrebné skontrolovať rozpustnosť testovanej chemikálie vo vode. Porovná sa DOC alebo koncentrácia testovanej chemikálie nameraná špecifickou analýzou zásobného roztoku a nominálna hodnota, aby sa zistilo, či je výťažnosť dostatočná (zvyčajne možno očakávať > 90 %). Je potrebné sa uistiť, najmä pri disperziách, či sa DOC môže alebo nemôže použiť ako analytický parameter alebo či sa môže použiť iba analytická metóda špecifická pre testovanú chemikáliu. Pri disperziách sa vyžaduje odstredenie vzoriek. Pri každej novej dávke sa odmeria DOC, COD alebo testovaná chemikália pomocou špecifickej analýzy.

▼M4

32. Určí sa pH zásobného roztoku. Z krajných hodnôt vyplýva, že pridanie chemikálie môže vplývať na pH aktivovaného kalu v testovacom systéme. V takom prípade je potrebné neutralizovať zásobný roztok na získanie pH 7 ± 0,5 pomocou malých množstiev anorganickej kyseliny alebo zásady, ale treba zabrániť zrážaniu testovanej chemikálie.

POSTUP

33. Opísaný postup je určený pre čistiarne s technológiou aktivovaného kalu. Pre systém pórovitej nádoby je potrebné ho mierne prispôsobiť.

Príprava inokula

34. Na začiatku testu sa testovací systém inokuluje buď s aktivovaným kalom, alebo inokulom obsahujúcim nízku koncentráciu mikroorganizmov. Inokulum je potrebné udržiavať prevzdušnené pri izbovej teplote až do jeho použitia a použiť ho do 24 hodín. V prvom prípade sa zoberie vzorka aktivovaného kalu z prevzdušňovacej nádrže účinne prevádzkovanej biologickej čistiarne odpadových vôd alebo z laboratórnej čistiarne, do ktorej sa dodávajú prevažne domáce splaškové vody. Ak sa simulujú nitrifikačné podmienky, kal sa odoberie z nitrifikačnej čistiarne odpadových vôd. Určí sa koncentrácia suspendovaných tuhých látok a v prípade potreby sa kal koncentruje usadením tak, aby bol objem pridaný do testovacieho systému čo najmenší. Je nutné zabezpečiť, aby bola počiatočná koncentrácia suchej hmoty približne 2,5 g/l.

35. V druhom prípade sa ako inokulum použije 2 – 10 ml/l výtoku z biologickej čistiarne domácich odpadových vôd. Na získanie čo najväčšieho počtu rôznych druhov baktérií môže byť užitočné pridať inokulá z viacerých iných zdrojov, napríklad z povrchovej vody. V takom prípade v testovacom systéme vznikne a pribudne aktivovaný kal.

Dávkovanie organického média

36. Zabezpečí sa, aby boli prítokové a výtokové nádoby a potrubia z prítokových nádob a do výtokových nádob dôkladne očistené, aby sa eliminovalo množenie mikróbov na začiatku a počas trvania testu. Testovacie systémy sa sústredia v miestnosti s kontrolovanou teplotou (zvyčajne v rozsahu 20 – 25 °C) alebo sa použijú testovacie jednotky s vodným plášťom. Pripraví sa dostatočný objem požadovaného organického média (odseky 27– 29). Najskôr sa prevzdušňovacia nádoba a separátor naplnia organickým médiom a pridá sa inokulum (odseky 34, 35). Začne sa s prevzdušňovaním tak, aby sa kal udržiaval v suspenzii a v aeróbnom stave, a následne sa začne s dávkovaním prítoku a recykláciou usadeného kalu. Organické médium sa dávkuje zo skladovacích nádob do prevzdušňovacích nádob (odseky 20, 21) testovacích a kontrolných jednotiek, pričom príslušné výtoky sa odoberú do podobných skladovacích nádob. S cieľom dosiahnuť bežný hydraulický retenčný čas 6 h sa organické médium prečerpáva rýchlosťou 0,5 l/h. Na účely potvrdenia tejto rýchlosti sa denné množstvo dávkovaného organického média odmeria tak, že sa zaznamená zníženie objemov média v skladovacích nádobách. Na zistenie účinkov prerušovaného vypúšťania a „šokového“ pridávania chemikálií by boli potrebné iné spôsoby dávkovania.

37. Ak sa organické médium pripravuje na použitie na obdobie dlhšie ako jeden deň, je potrebné chladenie pri teplote približne 4 °C alebo iné vhodné metódy konzervácie, aby sa predišlo množeniu mikróbov a biodegradácii mimo testovacích jednotiek (odsek 29). Ak sa použijú syntetické médiá, môže sa pripraviť a pri teplote približne 4 °C uskladniť koncentrovaný zásobný roztok (napr. desaťnásobok bežnej koncentrácie, odsek 28). Tento zásobný roztok možno pred použitím dôkladne zmiešať s primeraným množstvom vody z vodovodu, prípadne ho možno prečerpávať priamo, kým sa zvlášť prečerpáva primerané množstvo vody z vodovodu.

▼M4

Dávkovanie testovanej chemikálie

38. Primerané množstvo zásobného roztoku testovanej chemikálie (odsek 31) sa pridá do skladovacej nádoby prítoku alebo sa samostatnou pumpou dávkuje priamo do prevzdušňovacej nádoby. Bežná priemerná testovacia koncentrácia v prítoku by mala byť medzi 10 mg/l a 20 mg/l DOC s hornou koncentráciou nie vyššou ako 50 mg/l. Ak je testovaná chemikália slabo rozpustná vo vode alebo ak sú pravdepodobné toxické účinky, je potrebné znížiť koncentráciu na 5 mg/l DOC alebo aj menej, ale len v prípade, že je k dispozícii a vykoná sa vhodná špecifická analytická metóda (rozptýlené testované chemikálie, ktoré sú slabo rozpustné vo vode, sa môžu pridať s využitím špeciálnych dávkovacích metód, pozri dodatok 5).

39. Testovaná chemikália sa začne pridávať po uplynutí intervalu, v ktorom sa systém stabilizoval a účinne odstraňuje DOC organického média (približne 80 %). Pred pridaním testovanej chemikálie je dôležité skontrolovať, či všetky jednotky pracujú rovnako účinne. Ak to tak nie je, zvyčajne pomáha zmiešať jednotlivé kaly a do jednotlivých jednotiek znovu rozdeliť rovnaké objemy. Ak sa použije inokulum (približne) 2,5 g/l (suchá hmotnosť) aktivovaného kalu, testovaná chemikália sa môže pridávať od začiatku testu, lebo priame pridávanie zvyšujúcich sa množstiev od začiatku má tú výhodu, že aktivovaný kal môže byť schopný lepšie sa prispôsobiť testovanej chemikálii. Pri ktoromkoľvek spôsobe pridávania testovanej chemikálie sa odporúča v pravidelných intervaloch merať príslušnú rýchlosť prietoku a/alebo objemy v skladovacej nádobe (nádobách).

Manipulácia s aktivovaným kalom

40. Koncentrácia tuhých látok v aktivovanom kale sa zvyčajne v priebehu testu nezávisle od použitého inokula stabilizuje medzi limitmi v rozsahu 1 – 3 g/l (suchá hmotnosť) v závislosti od kvality a koncentrácie organického média, prevádzkových podmienok, charakteru prítomných mikroorganizmov a vplyvu testovanej chemikálie.

41. Buď sa určia suspendované tuhé látky v prevzdušňovacej nádobe aspoň raz týždenne a odoberie sa prebytočný kal s cieľom udržať koncentráciu na úrovni 1 – 3 g/l (suchá hmotnosť), alebo sa pri stálej hodnote kontroluje stredný vek kalu, zvyčajne v rozmedzí šesť až desať dní. Ak sa napríklad zvolí retenčný čas kalu v trvaní ôsmich dní, denne je potrebné odstrániť 1/8 objemu aktivovaného kalu v prevzdušňovacej nádobe a zlikvidovať ho. Tento postup sa vykonáva každý deň alebo podľa možnosti prostredníctvom automatickej prerušovane prevádzkovanej pumpy. Udržiavaním konštantnej koncentrácie suspendovaných tuhých látok alebo jej udržiavaním v rámci úzkych limitov sa nezachováva stály retenčný čas kalu (SRT), ktorý je prevádzkovou premennou podmieňujúcou hodnotu koncentrácie testovanej chemikálie vo výtoku.

42. Počas trvania testu sa aspoň raz denne odstráni všetok kal, ktorý sa zachytáva na stenách prevzdušňovacej nádoby a separátora, aby sa resuspendoval. Je potrebné pravidelne kontrolovať a čistiť všetky trubice a potrubia, aby sa predišlo rastu biofilmu. Usadený kal zo separátora sa recykluje do prevzdušňovacej nádoby podľa možnosti prerušovaným prečerpávaním. V systéme pórovitej nádoby nedochádza k recyklovaniu, ale je nutné zabezpečiť vloženie čistých vnútorných nádob, skôr než objem v nádobe výrazne stúpne (odsek 21).

43. V čistiarňach Husmann môže dochádzať k slabému usadzovaniu a strate kalu. To možno napraviť súbežným použitím jedného alebo viacerých krokov uvedených ďalej v testovacích aj kontrolných jednotkách:

— v pravidelných intervaloch, napr. raz týždenne, sa môže pridávať čerstvý kal alebo flokulačné činidlo (napríklad 2 ml/na nádobu 50 g/l $FeCl_3$), ale je potrebné sa uistiť, či nedochádza k žiadnej reakcii s $FeCl_3$ ani ku zrážaniu testovanej chemikálie,

▼M4

— vzduchové čerpadlo sa môže nahradiť peristaltickým čerpadlom, čím sa umožní približne rovnaký recirkulačný prietok kalu ako prítokový prietok, ktorý je potrebné použiť, a umožní sa vytvorenie anaeróbnej zóny v usadenom kale (geometria vzduchového čerpadla obmedzuje minimálny prietok navráteného kalu na približne 12-násobok prítokového prietoku),

— kal sa môže prečerpávať zo separátora do prevzdušňovacej nádoby prerušovane (napr. 5 min. každú 2,5 h s cieľom recyklovať 1 – 1,5 l/h,

— môže sa použiť netoxické protipeniace činidlo v minimálnej koncentrácii, aby sa predišlo strate v dôsledku penenia (napr. silikónový olej),

— do kalu v separátore sa môže v krátkych šokových dávkach púšťať vzduch (napr. 10 sekúnd každú hodinu),

— do prevzdušňovacej nádoby sa môže v intervaloch dávkovať organické médium (napr. 3 – 10 min. každú hodinu).

Odber vzoriek a analýza

44. V pravidelných intervaloch je potrebné merať koncentráciu rozpusteného kyslíka, teplotu a hodnotu pH aktivovaného kalu v prevzdušňovacích nádobách. Treba zabezpečiť, aby bol nepretržite k dispozícii dostatok kyslíka (> 2 mg/l) a aby bola teplota udržiavaná v požadovanom rozmedzí (zvyčajne 20 – 25 °C). Hodnota pH sa udržiava na úrovni 7,5 ± 0,5 pomocou dávkovania malých množstiev anorganickej zásady alebo kyseliny do prevzdušňovacej nádoby alebo do prítoku alebo pomocou zvyšovania tlmivej kapacity organického média (pozri odsek 27). Pri nitrifikácii dochádza k tvorbe kyseliny, pričom oxidácia 1 mg N vytvára približne 7 mg CO_3^-. Frekvencia meraní závisí od meraného parametra a od stability systému a môže byť rôzna medzi dennými a týždennými meraniami.

45. Odmeria sa DOC alebo COD v prítokoch do kontrolných a testovacích nádob. Koncentráciu testovanej chemikálie je potrebné odmerať v testovacom prítoku špecifickou analýzou alebo ju odhadnúť z koncentrácie v zásobnom roztoku (odsek 31), použitého objemu a množstva splaškových vôd dávkovaných do testovacej jednotky. Odporúča sa vypočítať koncentráciu testovanej chemikálie, aby sa znížila variabilita údajov týkajúcich sa koncentrácie.

46. Z odobratého výtoku sa zoberú vhodné vzorky (napr. 24-hodinové kompozity) a filtrujú sa cez membránu s veľkosťou pórov 0,45 μm alebo sa odstreďujú rýchlosťou približne 40 000 m/s^2 asi 15 min. Odstreďovanie by sa malo použiť, ak je filtrovanie zložité. Určí sa DOC alebo COD aspoň v dvoch vyhodnoteniach s cieľom zmerať konečnú biodegradáciu a v prípade potreby primárnu biodegradáciu analýzou špecifickou pre testovanú chemikáliu.

47. Použitie COD môže pri nízkych koncentráciách viesť k vzniku analytických problémov, preto sa odporúča iba pri použití dostatočne vysokej testovacej koncentrácie (približne 30 mg/l). Pri silne adsorbujúcich chemikáliách sa takisto odporúča merať množstvo adsorbovanej chemikálie v kale pomocou analytickej metódy špecifickej pre testovanú chemikáliu.

48. Frekvencia odoberania vzoriek závisí od očakávanej dĺžky testu. Odporúčaná frekvencia je trikrát týždenne. Keď sú jednotky v účinnej prevádzke, po zavedení testovanej chemikálie sa umožní ich adaptácia počas jedného až maximálne šiestich týždňov, aby dosiahli stabilný stav. Na vyhodnotenie výsledku testu je potrebné získať aspoň 15 platných hodnôt v rovnovážnej fáze (odsek 59), ktorá zvyčajne trvá tri týždne. Test sa môže ukončiť, ak sa dosiahne dostatočný stupeň eliminácie (napr. > 90 %) a ak je k dispozícii týchto 15 hodnôt, ktoré predstavujú analýzy vykonávané každý pracovný deň počas troch týždňov. Po pridaní testovanej chemikálie by test zvyčajne nemal trvať dlhšie ako 12 týždňov.

▼M4

49. Ak kal nitrifikuje a ak sa skúmajú účinky testovanej chemikálie na nitrifikáciu, aspoň raz týždenne sa analyzuje vzorka výtoku z testovacích a kontrolných jednotiek s cieľom zistiť, či neobsahuje amónium a/alebo dusitan a dusičnan.

50. Všetky analýzy by sa mali vykonať čo najskôr, najmä stanovenie dusíka. Ak sa analýzy musia odložiť, vzorky sa uskladnia v tme pri teplote približne 4 °C v plných, pevne uzavretých fľašiach. Ak musia byť vzorky uskladnené viac ako 48 hodín, zakonzervujú sa hlbokým zmrazením, acidifikáciou (napr. 10 ml/l z 400 g/l roztoku kyseliny sírovej) alebo pridaním vhodnej toxickej látky (napr. 20 ml/l z 10 g/l roztoku chloridu ortutnatého). Je potrebné zabezpečiť, aby metóda konzervácie neovplyvnila výsledky analýzy.

Spájanie testovacích jednotiek

51. Ak sa použije spájanie (dodatok 3), denne sa vymení rovnaké množstvo aktivovaného kalu (150 ml za 1 500 ml v prípade prevzdušňovacích nádob s obsahom troch litrov tekutiny) medzi prevzdušňovacími nádobami testovacej jednotky a jej kontrolnej jednotky. Ak testovaná látka silno adsorbuje na kale, vymení sa iba supernatant zo separátorov. V obidvoch prípadoch sa na výpočet výsledkov testu použije faktor korekcie (odsek 55).

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

52. Vypočíta sa percentuálna eliminácia DOC alebo COD testovanej chemikálie pre každé časované hodnotenie pomocou rovnice:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

kde

D_t = % eliminácie DOC alebo COD v čase t,

C_s = DOC alebo COD v prítoku v dôsledku testovanej chemikálie, podľa možnosti odhadnuté zo zásobného roztoku (mg/l),

E = nameraná hodnota DOC alebo COD v testovacom výtoku v čase t (mg/l),

E_o = nameraná hodnota DOC alebo COD v kontrolnom výtoku v čase t (mg/l).

53. Stupeň eliminácie DOC alebo COD organického média v kontrolnej jednotke je informácia užitočná pri hodnotení biodegradačnej činnosti aktivovaného kalu počas testu. Vypočíta sa percentuálna eliminácia z rovnice:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

kde

D_B = % eliminácia DOC alebo COD organického média v kontrolnej jednotke v čase t,

C_M = DOC alebo COD organického média v kontrolnom prítoku (mg/l).

▼M4

Môže sa zvoliť aj vypočítanie percentuálnej eliminácie DOC alebo COD v dôsledku organického média a testovanej chemikálie v testovacej jednotke z rovnice:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

kde

D_T = % eliminácie celkového testovacieho prítoku DOC alebo COD,

C_T = DOC alebo COD celkového testovacieho prítoku alebo vypočítané zo zásobných roztokov (mg/l).

54. Vypočíta sa eliminácia testovanej chemikálie, ak je meraná špecifickou analytickou metódou, pri každom časovom hodnotení z rovnice:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

kde

D_{ST} = % primárnej eliminácie testovanej chemikálie v čase t,

S_i = nameraná alebo odhadnutá koncentrácia testovanej chemikálie v testovacom prítoku (mg/l),

S_e = nameraná koncentrácia testovanej chemikálie v testovacom výtoku v čase t (mg/l).

55. Ak sa použilo spájanie, zriedenie testovanej chemikálie v prevzdušňovacej nádobe výmenou kalu sa kompenzuje pomocou faktoru korekcie (pozri dodatok 3). Ak sa použil stredný hydraulický retenčný čas 6 h a výmena polovice objemu aktivovaného kalu v prevzdušňovacej nádobe, stanovené denné hodnoty eliminácie (D_t, odsek 52) sa musia opraviť, aby sa získal skutočný stupeň eliminácie, D_{tc}, testovanej chemikálie z rovnice:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Vyjadrenie výsledkov testu

56. Zakreslí sa percentuálna eliminácia D_t (alebo D_{tc}) a D_{st}, ak je k dispozícii, v závislosti od času (pozri dodatok 2). Z tvaru krivky eliminácie testovanej chemikálie (*per se* alebo ako DOC) možno vyvodiť niekoľko záverov o procese odstraňovania.

Adsorpcia

57. Ak sa od začiatku testu pozoruje vysoká eliminácia DOC testovanej chemikálie, testovaná chemikália je pravdepodobne eliminovaná adsorpciou na tuhých látkach aktivovaného kalu. Je možné to dokázať určením adsorbovanej testovanej chemikálie pomocou špecifickej analýzy. Eliminácia DOC adsorbovateľných chemikálií zvyčajne neostáva vysoká počas celého testu. Bežne sa na začiatku vyskytne vysoký stupeň eliminácie, ktorý postupne klesá na rovnovážnu hodnotu. Ak by však adsorbovateľná testovaná chemikália nejakým spôsobom bola schopná spôsobiť aklimatizáciu populácie mikróbov, eliminácia DOC testovanej chemikálie by následne stúpla a dosiahla by hornú rovnovážnu hodnotu.

▼M4

Lag fáza

58. Podobne ako pri statických skríningových testoch si mnohé testované chemikálie vyžadujú pred úplnou biodegradáciou lag fázu. Počas lag fázy prebieha aklimatizácia alebo adaptácia degradačných baktérií pri takmer nulovej eliminácii testovanej chemikálie. Potom nastane počiatočné množenie týchto baktérií. Táto fáza sa končí a degradačná fáza sa začína, keď sa odstráni približne 10 % počiatočného množstva testovanej chemikálie (po umožnení adsorpcie, ak k nej dochádza). Lag fáza je často veľmi variabilná a slabo reprodukovateľná.

Rovnovážna fáza

59. Rovnovážna fáza krivky eliminácie v nepretržitom teste je vymedzená ako fáza, v ktorej nastáva maximálna degradácia. Rovnovážna fáza by mala trvať najmenej tri týždne a mala by mať približne 15 nameraných platných hodnôt.

Stredný stupeň eliminácie testovanej chemikálie

60. Vypočíta sa stredná hodnota z hodnôt eliminácie (D_t) testovanej chemikálie počas rovnovážnej fázy. Hodnota zaokrúhlená na celé číslo (1 %) predstavuje stupeň eliminácie testovanej chemikálie. Odporúča sa aj vypočítať 95 % interval spoľahlivosti strednej hodnoty.

Eliminácia organického média

61. Zakreslí sa percentuálna eliminácia DOC alebo COD organického média v kontrolnej jednotke (D_B) v závislosti od času. Stredný stupeň eliminácie sa označí rovnakým spôsobom ako v prípade testovanej chemikálie (odsek 60).

Indikácia biodegradácie

62. Ak testovaná chemikália výrazne neadsorbuje na aktivovanom kale a krivka eliminácie má typický tvar biodegradačnej krivky s lag, degradačnou a rovnovážnou fázou (odseky 58, 59), nameraná eliminácia sa môže s istotou pripísať biodegradácii. Ak bola počiatočná eliminácia vysoká, simulačný test nemôže rozlišovať medzi biologickými a abiotickými eliminačnými procesmi. V takých prípadoch a v prípade akýchkoľvek pochybností o biodegradácii (napr. ak dochádza k stripovaniu) sa vykoná analýza adsorbovanej testovanej chemikálie alebo ďalšie statické biodegradačné testy založené na parametroch, ktoré jednoznačne indikujú biologické procesy. Takými testmi sú metódy absorpcie kyslíka [kapitola C.4 D, E a F tejto prílohy (6)] alebo test s meraním tvorby oxidu uhličitého [kapitola C.4 C tejto prílohy (6)] alebo ISO metóda uzavretého priestoru nad kvapalinou (18) s použitím predexponovaného inokula zo simulačného testu. Ak sa odmerala eliminácia DOC aj eliminácia špecifickej chemikálie, výrazné rozdiely (v prípade prvej hodnoty nižšej ako druhej) medzi percentuálnou eliminá ciou indikujú prítomnosť organických medziproduktov vo výtokoch, ktoré sa môžu rozkladať ťažšie ako materská chemikália.

Platnosť výsledkov testu

63. Informácie o bežnom biodegradačnom správaní inokula sa získajú, ak sa určí stupeň eliminácie organického média (odsek 53) v kontrolnej jednotke. Test možno považovať za platný, ak po dvoch týždňoch stupeň eliminácie DOC alebo COD v kontrolnej jednotke (jednotkách) je > 80 % a nie sú pozorované žiadne nezvyčajné javy.

▼M4

64. Ak sa použila ľahko biodegradovateľná (referenčná) chemikália, stupeň biodegradácie (D_t, odsek 52) by mal byť > 90 %.

65. Ak sa test vykonáva v nitrifikačných podmienkach, stredná koncentrácia vo výtokoch by mala byť < 1 mg/l amoniaku-N a < 2 mg/l dusitanu-N.

66. Ak neboli splnené tieto kritériá (odseky 63 – 65), je potrebné opakovať test s použitím inokula z iného zdroja, testovať referenčnú chemikáliu a skontrolovať testovacie postupy.

Správa o teste

67. Správa o teste musí obsahovať:

Testovaná chemikália:

— identifikačné údaje,

— fyzikálny charakter a pokiaľ je to relevantné významné fyzikálno-chemické vlastnosti.

Podmienky testovania:

— druh testovacieho systému, všetky modifikácie pri testovaní nerozpustných a prchavých chemikálií,

— druh organického média,

— podiel a charakter priemyselných odpadových vôd prítomných v splaškových vodách, ak je známy,

— inokulum: charakter a miesto odberu, koncentrácia a jeho predpríprava,

— zásobný roztok testovanej chemikálie: obsah DOC a TOC, spôsob prípravy v prípade suspendovania, použitá testovacia koncentrácia, odôvodnenie v prípade hodnôt mimo rozsahu 10 – 20 mg/l DOC, metóda pridávania, dátum prvého pridania, všetky zmeny,

— stredný vek kalu a stredný hydraulický retenčný čas, metóda odstraňovania kalu, metódy na zamedzenie zväčšovaniu objemu, úbytok kalu atď.,

— použité analytické metódy,

— teplota počas testu,

— kvalita zväčšovania objemu kalu, objemový index kalu (SVI), suspendované tuhé látky v zmiešanej tekutine (MLSS),

— všetky odchýlky od štandardných postupov a všetky okolnosti, ktoré mohli ovplyvniť výsledky.

Výsledky testu:

— všetky namerané údaje (DOC, COD, špecifické analýzy, pH, teplota, koncentrácia kyslíka, suspendované tuhé látky, N chemikálie v prípade potreby,

— všetky vypočítané hodnoty D_t (alebo D_{tc}), D_B, D_{St} v tabuľkovej podobe a krivky eliminácie,

— informácie o lag a rovnovážnej fáze, trvanie testu, stupeň eliminácie testovanej chemikálie a organického média v kontrolnej jednotke spolu so štatistickými informáciami a vyjadreniami biodegradovateľnosti a platnosti testu,

— rozbor výsledkov.

▼M4

LITERATÚRA

1. Swisher, R. D. (1987). Surfactant Biodegradation, druhé vydanie. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 s

2. Nemecká vláda (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt. 1 No. 49: 698 – 706.

3. Painter, H. A., a King, E. F. (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No. 70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

4. Painter, H. A. a King, E. F. (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. Kapitola C.4 tejto prílohy, Stanovenie „ľahkej“ biodegradovateľnosti.

7. Kapitola C.12 tejto prílohy, Biodegradácia – upravený test SCAS.

8. Kapitola C.19 tejto prílohy, Odhad adsorpčného koeficientu (K_{OC}) na pôde a kale z odpadových vôd pomocou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC).

9. Gerike, P., a Fischer, W. K. (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157 – 173.

10. Gerike, P., a Fischer, W. K. (1981), ako (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45 – 55.

11. Painter, H. A., a 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 B. N., Muntau H., Angeletti G.

12. ISO 11733 (1995; revidované 2004). Stanovenie eliminácie a biodegradability organických zlúčenín vo vodnom prostredí. Simulačná skúška s aktivovaným kalom.

13. Birch, R. R. (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33 – 48.

14. Birch, R. R. (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340 – 343.

15. Gerike, P., Fischer, W. K., a 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., a 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. s. 91 – 98 ISBN 011 751661 9.

18. ISO 14593 (1998) Kvalita vody. Hodnotenie úplnej aeróbnej biodegradability organických látok vo vodnom prostredí. Metóda analýzy uvoľneného anorganického uhlíka v uzavretých nádobách (skúška CO_2 headspace).

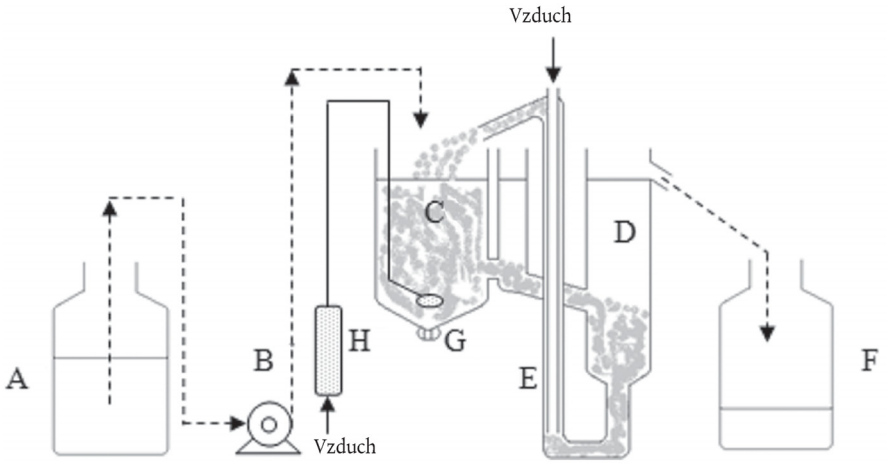
▼M4

Dodatok 1

Obrázok 1

Zariadenie používané na hodnotenie biodegradovateľnosti

Jednotka Husmann



A. Zásobná nádoba

B. Dávkovacie čerpadlo

C. Prevzdušňovacia komora (kapacita 31)

D. Usadzovacia nádrž

E. Vzduchové čerpadlo

F. Zberná nádoba

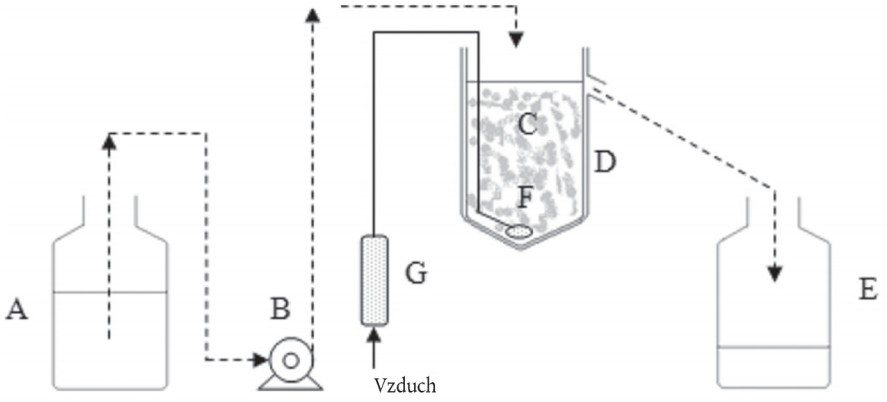
G. Prevzdušňovač

H. Vzduchový prietokomer

Obrázok 2

Zariadenie používané na hodnotenie biodegradovateľnosti

Pórovitá nádoba



A. Zásobná nádoba

B. Dávkovacie čerpadlo

C. Pórovitá prevzdušňovacia nádoba

D. Vonkajšia nepriepustná nádoba

E. Zberná nádoba

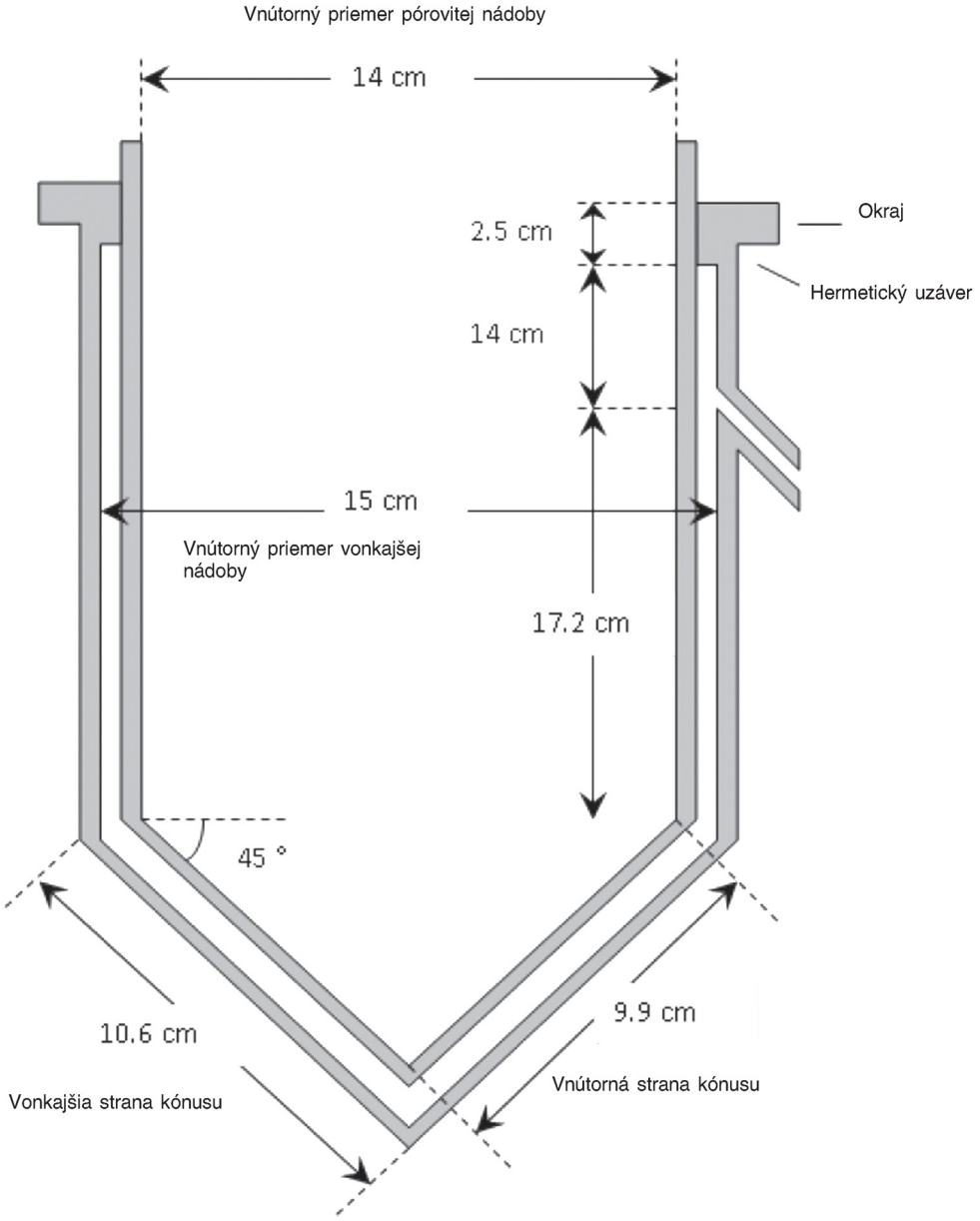
F. Difúzor

G. Vzduchový prietokomer

▼M4

Obrázok 3

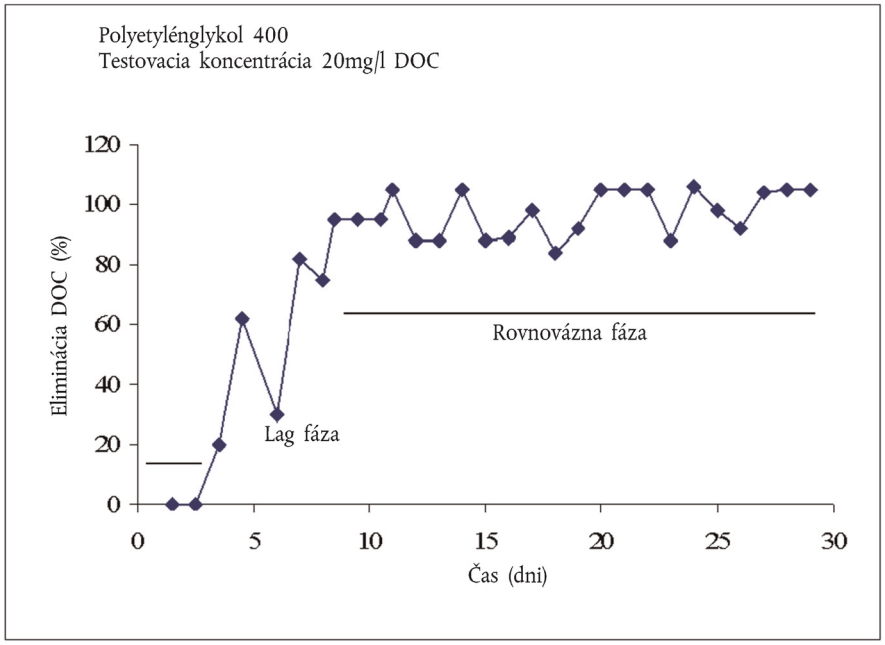
Detaily trojlitrovej pórovitej prevzdušňovacej nádoby



▼**M4**

Dodatok 2

Príklad krivky eliminácie



▼M4

Dodatok 3

[INFORMATÍVNY]

SPÁJANIE TESTOVACÍCH JEDNOTIEK

V úsilí o vyrovnanie populácie mikróbov v kaloch v testovacej jednotke, do ktorej sa pridávajú odpadové vody a testované chemikália, a v kontrolnej jednotke, do ktorej sa pridávajú iba odpadové vody, bola zavedená každodenná vzájomná výmena kalu (1). Postup sa nazýva spájanie a metóda je známa ako metóda spojených jednotiek. Spájanie sa prvýkrát vykonalo s použitím jednotiek Husmann s technológiou aktivovaného kalu, ale vykonáva sa aj s pórovitými nádobami (2) (3). Nezistili sa žiadne významné rozdiely vo výsledkoch medzi nespojenými a spojenými jednotkami, či už ide o jednotky Husmann alebo pórovité nádoby, preto z vynaloženého času a energie potrebnej na spájanie jednotiek nevyplýva žiadna výhoda.

Výmeny kalu môžu vytvárať dojem pomerne významnej eliminácie, lebo časť testovanej chemikálie sa prenesie a koncentrácie testovanej chemikálie v testovacích a kontrolných výtokoch sa do väčšej miery takmer vyrovnajú. Preto sa musia použiť faktory korekcie, ktoré závisia od vymenenej časti a stredného hydraulického retenčného času. Ďalšie informácie o výpočte boli uverejnené (1).

Vypočíta sa korigovaný stupeň eliminácie DOC alebo COD pomocou všeobecného vzorca:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

kde

D_{tc} = korigované % eliminácie DOC alebo COD,

D_t = stanovené % eliminácie DOC alebo COD,

a = vymenená časť objemu jednotiek s technológiou aktivovaného kalu,

r = stredný hydraulický retenčný čas (h).

Ak sa napríklad vymení polovica objemu prevzdušňovacej nádrže (a = 0,5) a stredný hydraulický retenčný čas je 6 h, korekčný vzorec je:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

LITERATÚRA

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, H. A., Bealing, D. J. (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. s. 113 – 138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen, B. N., Muntau, H., Angeletti, G.

3. Painter, H. A., King, E. F. (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

Dodatok 4

HODNOTENIE INHIBÍCIE AKTIVOVANÉHO KALU

Postup s testovanými chemikáliami

1. Chemikália (alebo odpadová voda) sa v simulačnom teste nemusí degradovať alebo odstrániť a môže mať na mikroorganizmy v kale dokonca inhibičný účinok. Iné chemikálie sa biodegradujú pri nízkych koncentráciách ale pri vyšších koncentráciách sú inhibičné (horméza). Inhibičné účinky sa môžu zistiť v skoršej fáze alebo sa môžu určiť v teste toxicity s použitím inokula podobného alebo rovnakého ako inokulum použité v simulačnom teste (1). Takýmito metódami sú inhibícia absorpcie kyslíka [kapitola C.11 tejto prílohy (2) a ISO 8192(3)] alebo inhibícia množenia organizmov v kale [ISO 15522 (4)].

2. V simulačnom teste sa inhibícia prejaví tak, že rozdiel v rozpustenom organickom uhlíku (DOC) alebo v chemickej spotrebe kyslíka (COD) medzi výtokom z testovacej nádoby a výtokom z kontrolnej nádoby bude väčší ako DOC pridaný ako testovaná chemikália. Inak povedané percentuálna eliminácia DOC (a biochemickej spotreby kyslíka BOD, chemickej spotreby kyslíka COD a/alebo NH^{+}_{4}) organického média pri čistení sa zníži prítomnosťou testovanej chemikálie. Ak taká situácia nastane, je potrebné test opakovať a znižovať koncentráciu testovanej chemikálie, až kým sa nedosiahne úroveň, pri ktorej nedochádza k inhibícii, prípadne koncentráciu ďalej znižovať, kým nedôjde k biodegradácii testovanej chemikálie. Ak má však testovaná chemikália (alebo odpadová voda) na proces nepriaznivé účinky pri všetkých koncentráciách, znamená to, že chemikáliu je možné ťažko, ak vôbec, biologicky spracovať, ale môže byť vhodné zopakovať test s aktivovaným kalom z iného zdroja a/alebo umožniť postupnejšiu aklimatizáciu kalu.

3. Naopak, ak sa testovaná chemikália v simulačnom teste bioeliminuje pri prvom pokuse, jej koncentrácia by sa mala zvýšiť, ak je nutné zistiť, či by chemikália mohla mať inhibičný účinok.

4. Pri určovaní stupňov inhibície je potrebné mať na pamäti, že populácia v aktivovanom kale sa môže meniť, takže mikroorganizmy si časom môžu vybudovať voči inhibičnej chemikálii toleranciu.

5. Výpočet stupňa inhibície:

   Celkové percentuálne eliminácie R_o pre BOD, DOC, COD atď. pre testovacie a kontrolné jednotky možno vypočítať podľa tohto vzorca:

$$R_o = 100(I - E)/I\%$$

   kde:

   I = koncentrácia BOD, DOC, COD atď. v prítoku pre testovacie alebo kontrolné nádoby (mg/l),

   E = príslušné koncentrácie vo výtoku (mg/l).

   I a E sa musia korigovať vzhľadom na DOC v dôsledku testovanej chemikálie v testovacích jednotkách, inak budú výpočty percentuálnej inhibície nesprávne.

▼**M4**

Stupeň inhibície spôsobený prítomnosťou testovanej chemikálie sa môže vypočítať podľa vzorca:

$$\% \text{ inhibície} = 100(R_c - R_t)/R_c$$

kde:

R_c = percentuálna eliminácia v kontrolných nádobách,

R_t = percentuálna eliminácia v testovacích nádobách.

LITERATÚRA

1. Reynolds, L. a kol. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2 259.

2. Kapitola C.11 tejto prílohy, Biodegradácia – respiračno-inhibičný test aktivovaného kalu.

3. ISO 8192 (2007) Kvalita vody. Skúška inhibície spotreby kyslíka aktivovaným kalom na oxidáciu uhlíka a amónnych iónov.

4. ISO 15522 (1999) Water Quality – Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

Dodatok 5

Testované chemikálie so slabou rozpustnosťou vo vode – prchavé chemikálie

Chemikálie so slabou rozpustnosťou vo vode

Podľa všetkého bolo publikovaných len málo správ o testoch chemikálií so slabou rozpustnosťou vo vode alebo nerozpustných chemikálií simulujúcich čistenie odpadových vôd (1) (2) (3).

Neexistuje ani jedna metóda disperzie testovanej chemikálie, ktorá by sa mohla aplikovať na všetky nerozpustné chemikálie. Dva zo štyroch druhov metód opísaných v norme ISO 10634 (4) sa zdajú byť vhodné na pokus o disperziu testovaných chemikálií pri simulačnom testovaní: je to použitie emulgátorov a/alebo ultrazvukovej energie. Je potrebné stanoviť stabilitu počas najmenej 24-hodinových intervalov výslednej disperzie. Vhodne stabilizované disperzie obsiahnuté v nádrži s nepretržitým miešaním (odsek 38) sa potom dávkujú do prevzdušňovacej nádrže oddelene od domácich splaškových vôd (alebo syntetických médií).

Ak sú disperzie stabilné, je potrebné preskúmať, ako možno testovanú chemikáliu určiť v disperznej forme. Je nepravdepodobné, že by bola vhodná hodnota DOC, preto je potrebné pre testovanú chemikáliu stanoviť špecifickú analytickú metódu, ktorá by sa mohla použiť na výtoky, tuhé látky vo výtokoch a aktivovaný kal. Osud testovanej chemikálie pri simulácii procesu aktivovaného kalu sa následne určí v tekutej a v tuhej fáze. Stanoví sa teda „hmotnostná bilancia“ s cieľom určiť, či sa testovaná chemikália biodegradovala. Tento postup by však indikoval iba primárnu biodegradáciu. Je potrebné pokúsiť sa o preukázanie úplnej biodegradácie prostredníctvom respirometrického testu na ľahkú biodegradovateľnosť [kapitola C.4 tejto prílohy (5) C, F alebo D] pomocou kalu exponovaného testovanej chemikálii v simulačnom teste ako inokula.

Prchavé chemikálie

Použitie simulácií čistenia odpadových vôd v prípade prchavých chemikálií je diskutabilné a problematické. Podobne ako v prípade testovaných chemikálií so slabou rozpustnosťou vo vode bolo zdá sa uverejnených len málo správ opisujúcich simulačné testy s použitím prchavých látok. Bežne používaný druh zariadenia na úplné miešanie sa upraví tak, že sa hermeticky uzavrú prevzdušňovacie a usadzovacie nádrže, pomocou prietokometrov sa meria a kontroluje prúd vzduchu a vychádzajúci plyn sa vháňa do zachytávačov s cieľom zachytiť prchavú organickú látku. V niektorých prípadoch sa používa vákuová pumpa na prečerpávanie vychádzajúceho plynu cez „studený“ zachytávač alebo čistiaci zachytávač obsahujúci Tenax a silikagél pre plynovochromatografickú analýzu. Testovaná chemikália prítomná v zachytávači sa môže určiť analyticky.

Test sa vykoná v dvoch častiach. Jednotky sa najskôr prevádzkujú bez kalu, ale so syntetickou odpadovou vodou a testovanou chemikáliou, ktorá sa prečerpáva do prevzdušňovacej nádrže. Niekoľko dní sa odoberajú vzorky prítoku, výtoku a vychádzajúceho plynu a analyzujú sa s cieľom zistiť, či neobsahujú testovanú chemikáliu. Zo zozbieraných údajov možno vypočítať percento (R_{vs}) testovanej chemikálie odobratej zo systému stripovaním.

Následne sa vykoná bežný biologický test (s kalom) za rovnakých prevádzkových podmienok ako v štúdii stripovania. Vykonajú sa aj merania DOC alebo COD s cieľom preveriť, či jednotky fungujú účinne. V prvej časti testu sa vykonajú príležitostné analýzy na stanovenie testovanej chemikálie v prítoku, výtoku a vychádzajúcom plyne. Po aklimatizácii sa analýzy robia častejšie. Z údajov v stabilnom stave možno opäť vypočítať percentuálnu elimináciu testovanej chemikálie z tekutej fázy všetkými postupmi (R_T) (fyzické a biologické), ako aj podiel (R_V), ktorý bol zo systému odobratý stripovaním.

▼**M4**

Výpočet:

a) V nebiologickom teste možno percento (R_{VP}) testovaného materiálu odobratého zo systému stripovaním vypočítať podľa tohto vzorca:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

kde

R_{VP} = eliminácia testovanej chemikálie vyprchaním (%),

S_{VP} = testovaná chemikália zachytená v zachytávači vyjadrená ako ekvivalentná koncentrácia v tekutej fáze (mg/l),

S_{IP} = koncentrácia testovanej chemikálie v prítoku (mg/l).

b) V biologickom teste možno percento (R_V) testovaného materiálu odobratého zo systému stripovaním vypočítať podľa tohto vzorca:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

kde

R_V = eliminácia testovanej chemikálie vyprchaním v biologickom teste (%),

S_V = testovaná chemikália zachytená v zachytávači v biologickom teste vyjadrená ako ekvivalentná koncentrácia v tekutom prítoku (mg/l),

S_I = koncentrácia testovanej chemikálie v prítoku (mg/l).

c) V biologickom teste sa percento (R_V) testovanej chemikálie odstránenej všetkými postupmi vypočíta takto:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

kde

S_E = koncentrácia testovanej chemikálie v (tekutom) výtoku (mg/l).

d) Percento (R_{BA}) odstránené biodegradáciou a adsorpciou teda možno vypočítať podľa tohto vzorca:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Je potrebné vykonať samostatné testy s cieľom určiť, či testovaná chemikália adsorbuje, a ak áno, možno urobiť ďalšiu korekciu.

e) Porovnanie podielu testovanej chemikálie odobratej stripovaním z biologického (R_v) a nebiologického testovacieho (R_{vp}) systému indikuje celkový účinok, ktorý má biologické spracovanie na emisiu testovanej chemikálie do ovzdušia.

Príklad: Benzén

Retenčný čas kalu = 4 dni

Syntetické médiá, retenčný čas = 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**

Teda

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % a R_{BA} = 85 %.

Usúdilo sa, že benzén neadsorboval na kale.

LITERATÚRA

1. Horn, J. A., Moyer, J. E., Hale, J. H. (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, E. L., Kincannon, D. F. (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

4. ISO 10634 (1995) Kvalita vody. Pokyny na prípravu a spracovanie organických látok málo rozpustných vo vode na následné hodnotenie ich biodegradability vo vodnom prostredí.

5. Kapitola C.4 tejto prílohy, Stanovenie „ľahkej“ biodegradovateľnosti.

▼M4

Dodatok 6

Účinky retenčného času kalu (SRT) na odbúrateľnosť chemikálií

ÚVOD

1. Metóda opísaná v základnom texte bola vypracovaná s cieľom uistiť sa, či sa testované chemikálie (zvyčajne tie, ktoré sú známe ako inherentné, nie však ľahko biodegradovateľné) môžu biodegradovať v rámci limitov súvisiacich s čistiarňami odpadových vôd. Výsledky sú vyjadrené ako percento eliminácie a percento biodegradácie. Prevádzkové podmienky jednotiek s technológiou aktivovaného kalu a výber prítoku umožňujú pomerne rozsiahle variácie koncentrácií testovanej chemikálie vo výtoku. Testy sa vykonávajú iba pri jednej nominálnej koncentrácii tuhých látok v kale alebo pri jednom nominálnom retenčnom čase kalu (SRT), pričom opísané režimy odstraňovania kalu môžu spôsobiť, že sa hodnota SRT počas testu bude výrazne meniť, a to zo dňa na deň, ako aj počas dňa.

2. V tomto variante (1) (2) sa SRT kontroluje v rámci oveľa užších limitov počas každého 24-hodinového intervalu (ako v prípade veľkých čistiarní), čo má za následok stálejšiu koncentráciu vo výtokoch. Odporúča sa použiť domáce splaškové vody, lebo umožňujú dôslednejšiu a vyššiu percentuálnu elimináciu. Skúmajú sa aj účinky viacerých hodnôt SRT a v podrobnejšej štúdii možno určiť účinky škály teplôt na koncentráciu vo výtoku.

3. Zatiaľ neexistuje všeobecná zhoda o tom, ktoré kinetické modely prebiehajú, keď sa chemikálie biodegradujú v podmienkach čistenia odpadových vôd. Pre zozbierané údaje bol vybratý Monodov model bakteriálneho rastu a využitia substrátu (1) (2), lebo táto metóda je určená iba pre chemikálie produkované vo veľkých hmotnostiach, ktorých koncentrácia v splaškových vodách je vyššia ako 1 mg/l. Platnosť zjednodušeného modelu a vyvodených predpokladov sa stanovila pomocou súboru etoxylátov alkoholov s rôznymi stupňami primárnej biodegradovateľnosti (2) (3).

Poznámka: Tento variant metódy sa úzko pridŕža väčšiny znenia tejto testovacej metódy C.10-A a ďalej sú uvedené iba tie údaje, ktoré sa líšia.

PRINCÍP TESTU

4. Jednotky pórovitých nádob s aktivovaným kalom navrhnuté s cieľom zabezpečiť (takmer) nepretržité odstraňovanie miešanej tekutiny umožňujúce veľmi presnú kontrolu retenčného času kalu (SRT alebo θ_s) sú prevádzkované bez spojenia pri niekoľkých retenčných časoch kalu (SRT) a nepovinne pri niekoľkých teplotách. Retenčný čas je zvyčajne dva až desať dní a teplota je v rozmedzí 5 a 20 °C. Splaškové vody, najlepšie domáce, a roztok testovanej chemikálie sa do jednotiek dávkujú zvlášť rýchlosťou, ktorou sa zabezpečí požadovaný retenčný čas splaškových vôd (tri až šesť hodín) a požadovaná koncentrácia testovanej chemikálie v prítoku. Na účely porovnávania súbežne fungujú kontrolné jednotky, do ktorých sa nepridáva testovaná chemikália.

5. Možno použiť aj iný druh zariadenia, ale je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa zabezpečila dobrá kontrola SRT. Napríklad pri použití čistiarní, ktoré zahŕňajú sedimentačnú nádrž, môže byť nevyhnutné stanoviť toleranciu straty tuhých látok cez výtok čistiarne. Takisto je potrebné prijať opatrenia, aby sa predišlo chybám v dôsledku kolísania množstva kalu v sedimentačnej nádrži.

▼M4

6. Jednotky sú prevádzkované v každom zvolenom súbore podmienok a po dosiahnutí rovnováhy sa získajú priemerné stabilné koncentrácie testovanej chemikálie vo výtokoch, prípadne aj DOC za obdobie približne troch týždňov. Okrem hodnotenia percentuálnej eliminácie testovanej chemikálie, prípadne DOC, sa v grafickej podobe vyjadrí aj vzťah medzi prevádzkovými podmienkami čistiarne a koncentráciou vo výtoku. Z tohto vyjadrenia možno vypočítať predbežné kinetické konštanty a predpovedať podmienky, za ktorých sa testovaná chemikália môže odbúrať.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

7. Kapitola C.10 A, uplatňujú sa odseky 12 a 13.

ÚROVNE ÚSPEŠNOSTI

8. Kapitola C.10 A, uplatňujú sa odseky 14 a 15.

REFERENČNÁ TESTOVANÁ CHEMIKÁLIA

9. Kapitola C.10 A, uplatňuje sa odsek 16

REPRODUKOVATEĽNOSŤ VÝSLEDKOV TESTU

10. Kapitola C.10 A, uplatňujú sa odseky 17 a 18.

OPIS METÓDY

Zariadenie

11. Vhodnou jednotkou je modifikovaný systém pórovitej nádoby (dodatok 6.1). Pozostáva z vnútornej nádoby (alebo vložky) vyrobenej z pórovitého polypropylénu s hrúbkou 3,2 mm a s veľkosťou pórov približne 90 μm, pričom spoj je bezšvový. (Ide o mohutnejšiu jednotku v porovnaní s jednotkou, ktorá je opísaná v odseku 21 tejto kapitoly C.10 A). Vložka je osadená do nepriepustnej polyetylénovej vonkajšej nádoby, ktorá sa skladá z dvoch častí: kruhová základňa s prevŕtanými dierami na umiestnenie dvoch vzduchovodov a trubice na odstránenie kalu, a vrchný valec, ktorý sa závitom pripevní na základňu a ktorý má vývod umiestnený tak, aby do pórovitej nádoby privádzal známy objem (3 l). Jeden zo vzduchovodov je osadený difúznym kameňom, druhý má otvorený koniec a je umiestnený v pravom uhle ku kameňu v nádobe. Tento systém vytvára potrebné vírenie zabezpečujúce, že obsah v nádobe sa dôkladne premiešava, a takisto zabezpečuje koncentrácie rozpusteného kyslíka vyššie ako 2 mg/l.

12. Zachováva sa primeraný počet jednotiek pri kontrolovaných teplotách v rozsahu od 5 do 20 °C (± 1 °C) buď vo vodných kúpeľoch, alebo v miestnostiach s konštantnou teplotou. Čerpadlá musia do prevzdušňovacích nádob dávkovať roztok testovanej chemikálie a usadené splaškové vody požadovanými rýchlosťami (0 – 1,0 ml/min a 0 – 25 ml/min) a tretie čerpadlo odstraňuje odpadový kal z prevzdušňovacích nádob. Potrebná veľmi nízka prietoková rýchlosť odpadového kalu sa dosiahne nastavením čerpadla na vyššiu rýchlosť, pričom jeho činnosť sa prerušuje pomocou časového spínača, napr. je činný desať sekúnd každú minútu pri rýchlosti prečerpávania 3 ml/min, čím sa dosiahne rýchlosť odstraňovania 0,5 ml/min.

Filtračné zariadenie alebo odstredivka

13. Kapitola C10 A, uplatňuje sa odsek 23.

Analytické zariadenie

14. Kapitola C.10 A, uplatňuje sa odsek 24.

Voda

▼**M4**

15. Kapitola C.10 A, uplatňujú sa odseky 25 a 26.

Organické médium

16. Kapitola C.10 A, uplatňuje sa odsek 27.

Syntetické médiá

17. Kapitola C.10 A, uplatňuje sa odsek 28.

Domáce splaškové vody

18. Kapitola C.10 A, uplatňuje sa odsek 29.

Aktivovaný kal

19. Kapitola C10 A, uplatňuje sa odsek 30.

Zásobné roztoky testovanej chemikálie

20. Kapitola C.10 A, uplatňujú sa odseky 31 a 32.

POSTUP

Príprava inokula

21. Kapitola C.10 A, uplatňuje sa iba odsek 34 – použije sa aktivovaný kal (približne 2,5 g/l).

Počet testovacích jednotiek

22. Pri jednoduchom teste, t. j. na meranie percentuálnej eliminácie, sa vyžaduje iba jeden SRT, ale na získanie údajov potrebných na výpočet predbežných kinetických konštánt je potrebných štyri alebo päť hodnôt SRT. Zvyčajne sa vyberú hodnoty medzi dvoma a desiatimi dňami. Z praktického hľadiska je vhodné vykonať test pri štyroch alebo piatich retenčných časoch kalu (SRT) súčasne pri jednej teplote. V rozšírených štúdiách sa použijú rovnaké hodnoty SRT alebo prípadne iný rozsah hodnôt pri iných teplotách v rozsahu 5 – 20 °C. Na primárnu biodegradáciu (základné použitie) je zvyčajne potrebná iba jedna jednotka pre daný súbor podmienok. Na úplnú biodegradáciu je však potrebná kontrolná jednotka pre každý súbor podmienok, do ktorej sa pridávajú splaškové vody, ale nie testovaná chemikália. Ak sa predpokladá prítomnosť testovanej chemikálie v použitých splaškových vodách, je potrebné pri hodnotení primárnej biodegradácie a aplikovaní potrebných korekcií vo výpočtoch použiť kontrolné jednotky.

Dávkovanie organického média a testovanej chemikálie

23. Kapitola C.10 A, platia odseky 36 – 39, ale treba zohľadniť skutočnosť, že roztok testovanej chemikálie sa dávkuje zvlášť a že sa použijú rôzne rýchlosti odstraňovania kalu. Takisto treba monitorovať a v prípade potreby upraviť, v rozsahu ± 10 %, prietokové rýchlosti prítokov, výtokov a odstraňovania kalu, napr. dvakrát denne. Ak sa v analytických metódach objavia problémy pri používaní domácich splaškových vôd, test je potrebné vykonať s použitím syntetických médií, treba sa však uistiť, že iné médiá prinesú porovnateľné kinetické údaje.

Manipulácia s jednotkami s technológiou aktivovaného kalu

24. Kapitola C.10 A, uplatňujú sa odseky 40 – 43, SRT však treba iba „konštantným“ odstraňovaním kalu.

Odber vzoriek a analýza

25. Kapitola C.10 A, platia odseky 44 – 50, s výnimkou, že je potrebné určiť koncentráciu testovanej chemikálie a nepovinne DOC, COD by sa nemala použiť.

▼M4

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

26. Kapitola C.10 A, uplatňujú sa odseky 52 – 54.

Vyjadrenie výsledkov testu

27. Kapitola C.10 A, uplatňujú sa odseky 56 – 62.

Výpočet kinetických konštánt

28. Je reálnejšie uviesť strednú stabilnú koncentráciu testovanej chemikálie vo výtoku a opísať, ako sa mení s prevádzkovými podmienkami čistiarne, ako uviesť percentuálnu primárnu biodegradáciu. To je možné zvážením rovnice (6) v dodatku 6.2, ktorá môže priniesť hodnoty pre K_S, μ_m a θ_{SC}, kritický retenčný čas kalu.

[Približné hodnoty K_S a μm možno prípadne získať pomocou jednoduchého počítačového programu s cieľom prispôsobiť teoretickú krivku vypočítanú z rovnice 2 (dodatok 6.2) získaným experimentálnym hodnotám. Hoci žiadny konkrétny roztok nebude jedinečný, možno získať primeranú približnú hodnotu K_S a μ_m.]

Variabilita výsledkov

29. Je bežnou praxou, že pre jednotlivé chemikálie sa získavajú premenlivé hodnoty kinetických parametrov. Predpokladá sa, že podmienky, v ktorých kal rástol, ako aj podmienky, ktoré prevažujú v použitom teste (podobne ako v odseku 5 a v iných testoch), majú veľký vplyv na výsledné hodnoty. Jednému aspektu tejto variability sa venoval Grady a kol. (4), ktorý navrhol používanie výrazov „existujúci“ a „vnútorný“ pre dve extrémne podmienky predstavujúce ohraničenie fyziologického stavu, ktorý môže kultúra dosiahnuť počas kinetického pokusu. Ak sa stav nesmie počas testu zmeniť, hodnoty kinetických parametrov odrážajú podmienky v prostredí, z ktorého boli mikroorganizmy odobraté. Tieto hodnoty sa nazývajú „existujúce“ alebo momentálne existujúce. Pri opačnom extréme, ak podmienky v teste dovoľujú úplné vytvorenie systému syntetizujúceho proteíny, ktorý umožňuje maximálnu možnú rýchlosť rastu, sa získané kinetické parametre nazývajú „vnútorné“ a závisia iba od charakteru substrátu a od druhov baktérií v kultúre. Pomôckou je, že existujúce hodnoty sa získajú udržiavaním nízkeho pomeru koncentrácie substrátu k príslušným mikroorganizmom (S_o/X_o), napr. 0,025, a vnútorné hodnoty sa získajú, keď je pomer vysoký, napr. najmenej 20. V obidvoch prípadoch by hodnota S_o mala byť rovná alebo vyššia ako príslušná hodnota Ks, konštanta polovičného nasýtenia.

30. Variabilita a iné aspekty biodegradačnej kinetiky sa preberali na nedávnom seminári SETAC (5). Takéto štúdie, o ktorých sa podali správy a ktoré sú plánované, by mali poskytnúť jasnejší pohľad na kinetiku prebiehajúcu v čistiarňach odpadových vôd, aby sa umožnila lepšia interpretácia existujúcich údajov a takisto aby sa v budúcnosti navrhovali vhodnejšie testovacie metódy.

LITERATÚRA:

1. Birch, R. R. (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33 – 48.

2. Birch, R. R. (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340 – 343.

3. Birch, R. R. (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Technická Biotechnol., 50: 411 – 422.

▼**M4**

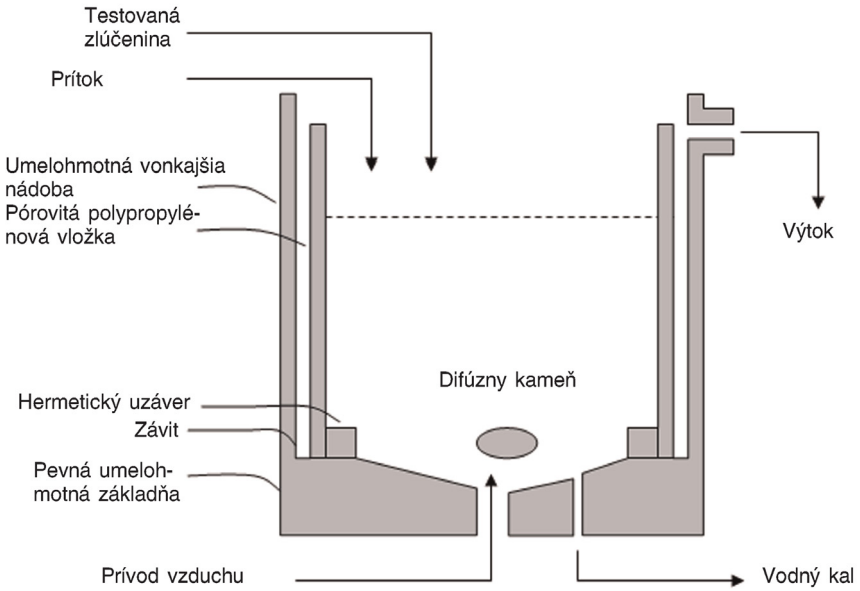
4. Grady, C. P. L., Smets, B. F., a Barbeau, D. S. (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742 – 748.

5. Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales S. G., Feitjel T., King H., Fox K., Verstraete W. 4. – 6. sept. 1996. SETAC- Európa, Brusel.

▼**M4**

Dodatok 6.1

Pórovitá nádoba s kontrolou SRT



▼M4

Dodatok 6.2

Výpočet kinetických konštánt

1. Za predpokladu, že sa použije Monodova kinetika, a s prihliadnutím na hmotnostnú rovnováhu aktívnych tuhých látok a substrátu v celom systéme aktivovaného kalu (1), možno získať tieto vyjadrenia stabilného stavu:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

alebo

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

kde

S_1 = koncentrácia substrátu vo výtoku, (mg/l),

K_S = konštanta polovičného nasýtenia, koncentrácia, pri ktorej $\mu = \mu_m/2$ (mg/l),

μ = špecifická miera rastu (d^{-1}),

μ_m = maximálna hodnota μ_m (d^{-1}),

K_d = špecifická rýchlosť rozpadu aktívnych tuhých látok (d^{-1}),

θ_S = stredný retenčný čas kalu, SRT d).

Preskúmanie tejto rovnice vedie k týmto záverom:

i) Koncentrácia vo výtoku je nezávislá od koncentrácie v prítoku (S_0), a preto sa percentuálna biodegradácia mení spolu s koncentráciou v prítoku, S_0.

ii) Jediný parameter kontrolovaný v čistiarni, ktorý má vplyv na S_1, je retenčný čas kalu, θ_S.

iii) Pre danú koncentráciu v prítoku, S_0, bude kritický retenčný čas kalu, takže:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

kde

θ_{SC} = kritický retenčný čas kalu, pod hranicou ktorého budú príslušné mikroorganizmy vymyté z čistiarne.

iv) Keďže ostatné parametre v rovnici (2) sú spojené s kinetikou rastu, teplota pravdepodobne ovplyvní úroveň substrátu vo výtoku a kritický vek kalu, t. j. retenčný čas kalu potrebný na dosiahnutie určitého stupňa čistenia sa s klesajúcou teplotou zvýši.

2. Podľa hmotnostnej bilancie tuhých látok v systéme pórovitej nádoby a za predpokladu, že koncentrácia tuhých látok vo výtoku čistiarne X_2 je v porovnaní s koncentráciou v prevzdušňovacej nádobe X_1 nízka, retenčný čas kalu

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

a

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

kde

V = objem prevzdušňovacej nádoby (l),

X_1 = koncentrácia tuhých látok v prevzdušňovacej nádobe (mg/l),

X_2 = koncentrácia tuhých látok vo výtoku (mg/l),

Q_0 = prietoková rýchlosť prítoku (l/d),

Q_1 = prietoková rýchlosť odpadového kalu (l/d).

Retenčný čas kalu teda možno kontrolovať pri akejkoľvek vopred zvolenej hodnote prostredníctvom kontroly prietokovej rýchlosti odpadového kalu, Q_1.

Závery

3. Hlavným účelom testu je teda umožniť predvídanie koncentrácie vo výtoku, a teda aj úrovne testovanej chemikálie vo vode, do ktorej sa chemikália pridáva.

4. Zakreslením S_1 oproti θ_S možno niekedy okamžite vyhodnotiť kritický retenčný čas kalu, θ_{SC}, napr. krivka 3 na obrázku 1. Ak to nie je možné, θ_{SC} spolu s približnými hodnotami μ_m a K_S možno vypočítať zakreslením S_1 oproti $S_1 \bullet \theta_S$.

Podľa úpravy rovnice (1):

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Ak je K_d nízke, potom $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$ a z rovnice [5] dostaneme:

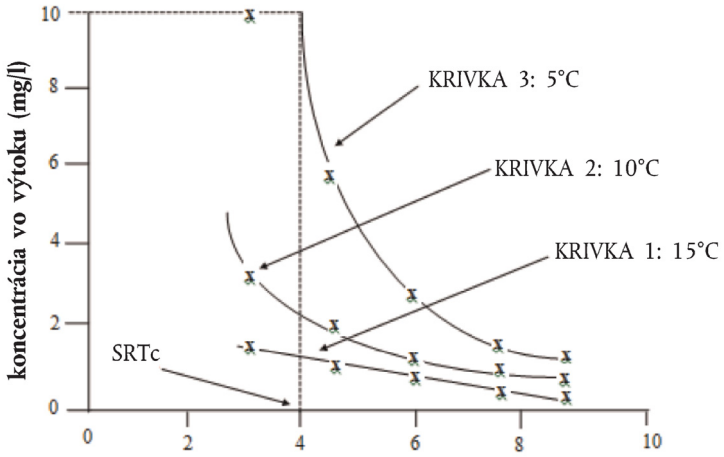
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Nákres by teda mala byť rovná priamka (pozri obrázok 2) so sklonom $1/\mu_m$ a priesečníkom K_S/μ_m; takisto $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

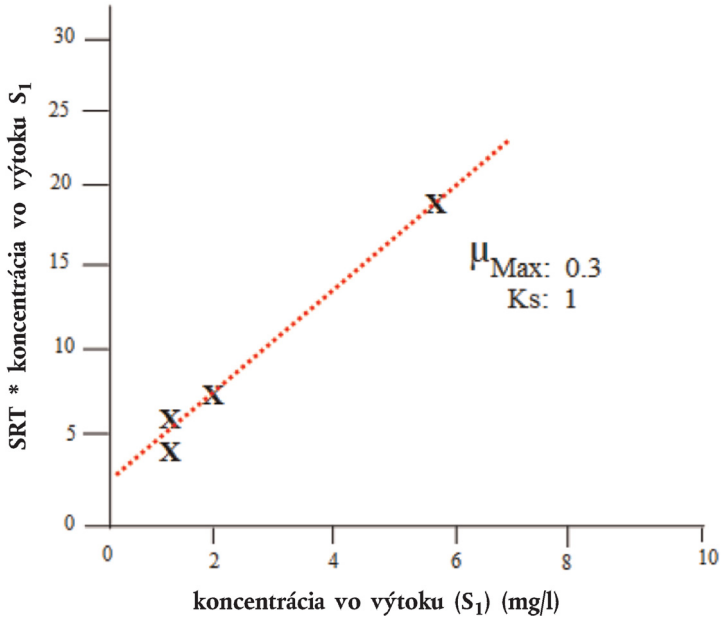
Obrázok 1

Tri teploty, päť retenčných časov kalu SRT



Obrázok 2

Regresná krivka SRT · S_1 oproti S_1, keď T = 5 °C



Glosár:

Koncentrácia vo výtoku:

Krivka:

▼M4

Dodatok 7

TEST PRI NÍZKOM (μg/l) ROZSAHU KONCENTRÁCIE

1. Mnohé chemikálie sú vo vodnom prostredí, dokonca v odpadových vodách, bežne prítomné pri veľmi nízkych koncentráciách (μg/l). Pri takýchto koncentráciách pravdepodobne neslúžia ako primárny substrát pre rast, ale oveľa pravdepodobnejšie degradujú ako nerastové, sekundárne substráty prítomné súčasne s množstvom prirodzene sa vyskytujúcich uhlíkových chemikálií. Degradácie týchto chemikálií preto nezodpovedajú modelu opísanému v dodatku 6. Existuje veľa modelov, ktoré by sa mohli použiť, a v podmienkach prevažujúcich v čistiarňach odpadových vôd by mohli prebiehať viaceré súčasne. Na objasnenie tohto problému bude potrebný ďalší rozsiahlejší výskum.

2. Dovtedy sa možno riadiť postupom uvedeným v základnom texte (kapitola C.10 A), ale len pre primárnu biodegradovateľnosť s použitím primerane nízkych koncentrácií (< 100 μg/l) a validovaného analytického postupu. Percentuálnu biodegradáciu možno vypočítať (pozri odsek 54 testovacej metódy), ak sa zohľadnia abiotické procesy (adsorpcia, prchavosť atď.). Príkladom je štúdia, ktorú vypracoval Nyholm a jeho spolupracovníci (1) (2), využívajúca štvorhodinový cyklus v systéme plnenia a odčerpávania. Do správy uviedli pseudokonštanty prvého rádu pre päť chemikálií pridaných do syntetických médií v koncentrácii 5 – 100 μg/l. (Pre úplnú biodegradovateľnosť sa môžu použiť testované chemikálie označené ^{14}C. Tento opis presahuje rámec tejto testovacej metódy, lebo zatiaľ neexistuje zhoda o postupoch, hoci navrhovaná metóda pre ISO 14592 (3) obsahuje usmernenie k použitiu chemikálií označených ^{14}C.).

SCAS test

3. Neskôr bol navrhnutý jednoduchší dvojfázový test (4) (5) (6), po metóde polosúvislého aktivovaného kalu (SCAS) nasledujú krátkodobé kinetické testy na vzorkách odobratých z jednotiek SCAS. SCAS systém funguje so známymi rýchlosťami odstraňovania kalu (na rozdiel od pôvodnej testovacej metódy C.12) a napúšťa sa modifikovanými syntetickými médiami OECD alebo domácimi splaškovými vodami. Syntetické médiá boli modifikované (z dôvodu meniacej sa hodnoty pH a slabej usadzovacej schopnosti kalu) pridaním fosfátu ako tlmivého roztoku, kvasnicového extraktu, chloridu železitého a stopových prvkov solí a ich COD sa zvýšila približne na 750 mg/l zvýšením koncentrácie peptónu a mäsového extraktu. Jednotky boli prevádzkované v 24-hodinovom cykle: prevzdušňovanie počas 23 h, odstraňovanie kalu, usadzovanie, odoberanie supernatantu (výtok), po ktorom nasledovalo pridanie syntetických médií a testovanej chemikálie až na úroveň 100 μg/l, (t. j. pri približne rovnakej koncentrácii ako v krátkodobom teste). Raz týždenne sa vymenilo 10 % celkového kalu za čerstvý kal, aby sa zachovala vyvážená populácia mikróbov.

4. Koncentrácie testovanej chemikálie sa merajú na začiatku a na konci prevdzušňovania a test pokračuje, až kým sa nedosiahne konštantná eliminácia testovanej chemikálie, čo trvá od jedného týždňa až niekoľko mesiacov.

Krátkodobý test

5. Krátkodobý test (napr. osem hodín) sa používa na určenie (pseudo)konštanty kinetickej rýchlosti prvého rádu pre rozklad testovanej chemikálie v aktivovanom kale známeho ale rozdielneho pôvodu a histórie. Konkrétne, vzorky kalu sa odoberajú zo SCAS reaktorov – na konci prevzdušňovacieho obdobia, keď je koncentrácia organického substrátu nízka – v priebehu testu aklimatizácie (odseky 3, 4). Kal sa môže na porovnanie odobrať aj zo súbežnej SCAS

▼M4

jednotky, ktorá nebola exponovaná testovanej chemikálii. Zmesi kalu a testovanej chemikálie pridané v dvoch alebo viacerých koncentráciách v rozsahu 1 – 50 μg/l sa prevzdušňujú bez pridávania syntetických médií alebo iného organického substrátu. Testovaná chemikália, ktorá ostala v roztoku, sa určuje v pravidelných intervaloch, napr. každú hodinu, v závislosti od degradovateľnosti chemikálie v období nepresahujúcom 24 h Vzorky sa pred príslušnou analýzou odstredia.

Výpočty

6. Údaje zo SCAS jednotiek sa použijú na výpočet percentuálnej eliminácie testovanej chemikálie (odsek 54). Takisto konštantu priemernej rýchlosti K_1, (štandardizovanú pre koncentráciu suspendovaných tuhých látok) možno vypočítať podľa vzorca:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

kde

t = čas prevzdušňovania (23 h),

C_e = koncentrácia na konci prevzdušňovacieho obdobia (μg/l),

C_i = koncentrácia na začiatku prevzdušňovania (μg/l),

SS = koncentrácia tuhých látok v aktivovanom kale (g/l).

7. V krátkodobom teste sa zakreslí log % zostávajúcej koncentrácie v závislosti od času, pričom sklon počiatočnej časti (10 – 50 % degradácia) grafu je ekvivalentný s K_1, (pseudo)konštantou prvého rádu. Konštanta sa štandardizuje vzhľadom na koncentráciu tuhých látok v kale prostredníctvom rozdelenia sklonu koncentráciou tuhých látok v kale. Výsledok uvedený v správe musí zahŕňať aj údaje o počiatočných koncentráciách testovanej chemikálie a suspendovaných tuhých látok, retenčnom čase kalu, aplikácii a zdroji kalu, ako aj údaje o predchádzajúcej expozícii (ak k nej došlo) testovanej chemikálii.

Variabilita výsledkov

8. Variabilita a iné aspekty biodegradačnej kinetiky sa preberali na nedávnom seminári SETAC (7). Takéto štúdie, o ktorých sa podali správy a ktoré sú plánované, by mali poskytnúť jasnejší pohľad na kinetiku prebiehajúcu v čistiarňach odpadových vôd, aby sa umožnila lepšia interpretácia existujúcich údajov a takisto aby sa v budúcnosti navrhovali vhodnejšie testovacie metódy.

LITERATÚRA

1. Nyholm, N., Jacobsen, B. N., Pedersen, B. M., Poulsen, O., Dambourg, A., a Schultz, B. (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339 – 353.

2. Jacobsen, B. N., Nyholm, N., Pedersen, B. M., Poulsen, O., a 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). Kvalita vody – hodnotenie aeróbnej biodegradovateľnosti organických zlúčenín pri nízkych koncentráciách vo vode.

▼**M4**

4. Nyholm, N., Ingerslev, F., Berg, U. T., Pedersen, J. P., a 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, U. T., a 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. Ministerstvo životného prostredia a energetiky, Kodaň.

7. Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, S. G. Feitjel, T. King, H. Fox, K. a Verstraete, W. 4. – 6. sept. 1996. SETAC- Európa, Brusel.

▼M4

C.10-B: Biofilmy

ÚVOD

1. Simulačné testy sa zvyčajne používajú pri chemikáliách, ktoré nevyhoveli skríningovému testu ľahkej biodegradovateľnosti [kapitola C.5 A – F tejto prílohy (9)], ale úspešne prešli testom inherentnej biodegradovateľnosti. Výnimočne sa simulačné testy používajú aj v prípade akejkoľvek chemikálie, o ktorej je potrebné získať viac informácií, najmä v prípade veľkotonážnych chemikálií, pričom zvyčajne sa použije test s aktivovaným kalom (C.10 A). Za určitých okolností sú však potrebné špecifické informácie, ktoré vypovedajú o vzťahu medzi správaním chemikálie a metódami čistenia odpadových vôd zahŕňajúcimi biofilmy, konkrétne perkolačné alebo prekvapkávajúce filtre, rotačné biologické reaktory, fluidné lôžka. S cieľom vyhovieť tejto potrebe boli vytvorené rôzne zariadenia.

2. Gerike a kolektív (1) použili veľké pilotné prekvapkávajúce filtre, ktoré použili v spojení. Tieto filtre zaberali veľa priestoru a vyžadovali si pomerne veľké množstvá splaškových vôd alebo syntetických médií. Truesdale a kolektív (2) opísali menšie filtre (priemer 183 cm × 152 mm), do ktorých sa napúšťali prírodné splaškové vody bez povrchovo aktívnych činidiel, ale stále boli potrebné pomerne veľké množstvá. Na vytvorenie „zrelého“ biofilmu bolo potrebných až 14 týždňov, a kým došlo k aklimatizácii po prvom zavedení testovaného povrchovo aktívneho činidla, bolo potrebných ďalších štyri až osem týždňov.

3. Baumann a kolektív (3) vytvorili oveľa menší filter, ktorý ako inertné médium na podporu biofilmu využíval polyesterovú „vlnu“, ktorá sa predtým namočila do aktivovaného kalu. Testovaná chemikália sa použila ako jediný zdroj uhlíka a biodegradovateľnosť sa hodnotila z meraní rozpusteného organického uhlíka (DOC) v prítoku a výtoku a z množstva CO_2 vo vychádzajúcom plyne.

4. Celkom odlišný prístup zaujali Gloyna a kolektív (4), ktorí vynašli rotačný tubulárny reaktor. Na vnútornom povrchu rotačnej trubice sa na známej povrchovej ploche vytvoril biofilm privádzaním prítoku na horný koniec trubice naklonenej k horizontálnej úrovni pod malým uhlom. Reaktor sa použil na pozorovanie biodegradovateľnosti povrchovo aktívnych činidiel (5), ako aj na skúmanie optimálnej hrúbky biofilmu a difúzie cez film (6). Títo autori reaktor ďalej vyvíjali a upravovali, aby bol schopný určiť CO_2 vo vychádzajúcom plyne.

5. Rotačný tubulárny reaktor prijal Stály výbor analytikov (Spojené kráľovstvo) ako štandardnú metódu na hodnotenie biodegradovateľnosti chemikálií (7) a odbúrateľnosti a toxicity odpadových vôd (8). Výhodami opísanej metódy sú jednoduchosť, kompaktnosť, reprodukovateľnosť a potreba pomerne malých množstiev organického média.

PRINCÍP TESTU

6. Na vnútorný povrch pomaly rotujúcej naklonenej trubice sa aplikujú syntetické médiá alebo domáce splaškové vody a testovaná chemikália v prímesi alebo samostatne. Na vnútornom povrchu sa vytvorí vrstva mikroorganizmov podobných tým, ktoré sú prítomné na médiách s biofiltrami. Podmienky činnosti reaktora sa zvolia tak, aby sa zabezpečila primeraná eliminácia organickej hmoty a, ak sa to požaduje, oxidácia amónia.

▼M4

7. Výtok z trubice sa odoberie a pred analýzou na zistenie rozpusteného organického uhlíka (DOC) a/alebo testovanej chemikálie pomocou špecifickej metódy sa buď usadí a/alebo prefiltruje. Na účely porovnávania súbežne a za tých istých podmienok fungujú kontrolné jednotky, do ktorých sa nepridáva testovaná chemikália. Predpokladá sa, že rozdiel medzi koncentráciami DOC vo výtoku z testovacích a kontrolných jednotiek vzniká v dôsledku testovanej chemikálie a jej organických metabolitov. Tento rozdiel sa porovná s koncentráciou pridanej testovanej chemikálie (ako DOC) s cieľom vypočítať elimináciu testovanej chemikálie.

8. Biodegradáciu možno od bioadsorpcie bežne odlíšiť na základe dôkladného preskúmania krivky eliminácie v závislosti od času. Potvrdiť ju zvyčajne možno pomocou testu ľahkej biodegradovateľnosti (absorpcia kyslíka alebo tvorba oxidu uhličitého) s použitím aklimatizovaného inokula odobratého na konci testu z reaktorov, do ktorých sa pridáva testovaná chemikália.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

9. Je potrebné poznať čistotu, rozpustnosť vo vode, prchavosť a adsorpčné vlastnosti testovanej chemikálie, aby bolo možné správne interpretovať výsledky.

10. Prchavé a slabo rozpustné chemikálie sa zvyčajne nemôžu testovať, pokiaľ sa neprijmú zvláštne opatrenia (pozri dodatok 5 ku kapitole C.10 A). Je nutné poznať aj chemickú štruktúru alebo aspoň empirický vzorec, aby bolo možné vypočítať teoretické hodnoty a/alebo skontrolovať namerané hodnoty parametrov, napr. teoretickú spotrebu kyslíka (ThOD).

11. Informácie týkajúce sa toxicity testovanej chemikálie pre mikroorganizmy (pozri dodatok 4 ku kapitole C.10 A) môžu byť užitočné pri výbere vhodných testovaných koncentrácií a môžu byť nevyhnutné na správnu interpretáciu nízkych hodnôt biodegradácie.

ÚROVNE ÚSPEŠNOSTI

12. Pôvodne sa požadovalo, aby primárna biodegradácia povrchovo aktívnych činidiel dosahovala úroveň 80 % alebo viac, skôr než bolo možné uviesť chemikáliu na trh. Ak sa nedosiahne hodnota 80 %, môže sa použiť tento simulačný (potvrdzujúci) test a povrchovo aktívne činidlo možno uviesť na trh, iba ak sa odstráni viac ako 90 % špecifickej chemikálie. Pri chemikáliách vo všeobecnosti nevzniká otázka úspešnej/neúspešnej úrovne a hodnota percentuálnej eliminácie sa môže použiť v približných výpočtoch pravdepodobnej koncentrácie v životnom prostredí, ktoré sa použijú v hodnotení rizika predstavovaného chemikáliami. V mnohých štúdiách čistých chemikálií sa zistilo, že percentuálna eliminácia DOC je > 90 % v prípade viac ako troch štvrtín chemikálií a > 80 % pri vyše 90 % chemikálií, ktoré vykazovali významný stupeň biodegradovateľnosti.

REFERENČNÉ CHEMIKÁLIE

13. S cieľom zabezpečiť správne vykonanie experimentálneho postupu je užitočné príležitostne testovať aj referenčné chemikálie, ktorých správanie je známe. Medzi také chemikálie patrí kyselina adipová, 2-fenylfenol, 1-naftol, kyselina 2,2-bifenyldikarboxylová a kyselina 1-naftoová.

REPRODUKOVATEĽNOSŤ VÝSLEDKOV TESTU

14. Laboratórium v Spojenom kráľovstve zistilo, že relatívna smerodajná odchýlka v rámci testov je 3,5 % a medzi testmi 5 % (7).

▼M4

OPIS METÓDY

Zariadenie

Rotujúce tubulárne reaktory

15. Zariadenie (pozri obrázky 1 a 2 v dodatku 8) pozostáva z banky z akrylových trubíc, z ktorých každá má dĺžku 30,5 cm a jej vnútorný priemer je 5 cm, podopretej kolesami s gumovým lemovaním upevnenými v kovovom podpernom ráme. Každá trubica má vonkajší okraj, s hĺbkou približne 0,5 cm, ktorým je zaistená na kolesách, vnútorný povrch je zdrsnený hrubou drôtenkou a na hornom (prívodnom) konci sa nachádza vnútorný okraj na zadržiavanie tekutiny s hĺbkou 0,5 cm. Trubice sú naklonené v uhle približne jeden stupeň k horizontálnej úrovni, aby sa zabezpečil požadovaný kontaktný čas, keď sa testovacie médium aplikuje do čistej trubice. Kolesá s gumovými pneumatikami sa otáčajú pôsobením pomalého motora s variabilnou rýchlosťou. Teplota trubíc sa kontroluje tak, že trubice sa uložia do miestnosti s konštantnou teplotou.

16. Vďaka tomu, že každý tubulárny reaktor sa vloží do mierne väčšej trubice s uzáverom a že sa zabezpečia plynotesné prepojenia, možno na účely ďalšieho merania odobrať vychádzajúci plyn CO_2 v alkalickom roztoku (6).

17. 24-hodinový prívod organického média podľa možnosti s pridanou testovanou chemikáliou do každej trubice sa nachádza v 20-litrovej zásobnej nádobe (A) (pozri obrázok 2). Ak sa to požaduje, roztok testovanej chemikálie sa môže dávkovať samostatne. V blízkosti dna každej zásobnej nádoby sa nachádza vývod, ktorý je vhodnou trubicou, napr. zo silikónového kaučuku, prostredníctvom peristaltického čerpadla (B) pripojený ku sklenej alebo akrylovej prívodnej trubici, ktorá vstupuje v rozsahu 2 – 4 cm do vyššieho (prívodného) konca naklonenej trubice (C). Výtok sa nechá odkvapkávať z nižšieho konca naklonenej trubice, aby sa zozbieral v inej zásobnej nádobe (D). Pred analýzou sa výtok usadí alebo prefiltruje.

Filtračné zariadenie – odstredivka

18. Prístroj na filtráciu vzoriek s membránovými filtrami vhodnej pórovitosti (nominálny priemer otvoru 0,45 μm), ktoré adsorbujú organické chemikálie a uvoľňujú organický uhlík v minimálnej miere. Ak sa použijú filtre, ktoré uvoľňujú organický uhlík, je potrebné dôkladne ich umyť horúcou vodou, aby sa odstránil vylúhovateľný organický uhlík. Prípadne sa môže použiť odstredivka schopná dosiahnuť 40 000 m/s^2.

19. Analytické vybavenie na stanovenie týchto parametrov:

— DOC/celkový organický uhlík (TOC) alebo chemická spotreba kyslíka (COD),

— špecifická chemikália (HPLC, GC atď.), ak sa požaduje,

— pH, teplota, kyslosť, zásaditosť,

— amónium, dusitan, dusičnan, ak sa testy vykonávajú v nitrifikačných podmienkach.

Voda

20. Voda z vodovodu s obsahom DOC nižším ako 3 mg/l.

21. Destilovaná alebo deionizovaná voda s obsahom DOC nižším ako 2 mg/l.

▼M4

Organické médium

22. Ako organické médium možno použiť syntetické médiá, domáce splaškové vody alebo zmes obidvoch. Ukázalo sa, že pri použití samotných domácich splaškových vôd často dochádza k zvýšenej percentuálnej eliminácii DOC (v jednotkách s technológiou aktivovaného kalu) a dokonca je možná biodegradácia niektorých chemikálií, ktoré nepodliehajú biodegradácii pri použití syntetických médií OECD. Preto sa odporúča používať domáce splaškové vody. Meria sa koncentrácia DOC alebo COD v každej novej dávke organického média. Je potrebné poznať kyslosť alebo zásaditosť organického média. Médium môže vyžadovať pridanie vhodného tlmivého roztoku (hydrogénuhličitan sodný alebo hydrogénfosforečnan draselný), ak má nízku kyslosť alebo zásaditosť, aby počas testu v reaktore ostalo zachované pH s hodnotou približne 7,5 ± 0,5. O množstve a čase pridania tlmivého roztoku sa rozhoduje individuálne pre každý prípad.

Syntetické médiá

23. V každom jednom litri vody z vodovodu sa rozpustí: 160 mg peptónu, 110 mg mäsového extraktu, 30 mg močoviny, 28 mg bezvodého hydrogénfosforečnanu draselného (K_2HPO_4), 7 mg chloridu sodného (NaCl), 4 mg dihydrátu chloridu vápenatého ($CaCl_2.2H_2O$), 2 mg heptahydrátu síranu horečnatého ($MgSO_4.7H_2O$). Toto syntetické médium OECD je uvedené ako príklad a zabezpečuje strednú koncentráciu DOC v prítoku v hodnote približne 100 mg/l. Môžu sa prípadne použiť iné zloženia s približne rovnakou koncentráciou DOC, ktoré sa viac približujú skutočným splaškovým vodám. Tieto syntetické médiá sa môžu pripraviť v destilovanej vode v koncentrovanej forme a až do jedného týždňa skladovať pri teplote približne 1 °C. V prípade potreby sa zriedia vodou z vodovodu. (Toto médium nie je vyhovujúce, napr. koncentrácia dusíka je veľmi vysoká, pomerne nízky obsah uhlíka, ale nebolo navrhnuté nič lepšie okrem pridania ďalšieho fosfátu ako tlmivého roztoku a ďalšieho peptónu).

Domáce splaškové vody

24. Použijú sa čerstvo usadené splaškové vody zbierané denne z čistiarní odpadových vôd, do ktorých sa dodávajú prevažne domáce splaškové vody. Mali by sa odobrať z prietokového kanála nádrže primárnej sedimentácie alebo z prívodu do čistiarne s technológiou aktivovaného kalu a mali by byť vo veľkej miere zbavené hrubých častíc. Splaškové vody sa môžu použiť po niekoľkodňovom uskladnení pri teplote približne 4 °C, ak sa preukáže, že DOC (alebo COD) sa počas uskladnenia výrazne nezníži (t. j. o menej ako 20 %). Na obmedzenie porúch systému je potrebné pred použitím upraviť DOC (alebo COD) každej novej dávky na vhodnú stálu hodnotu, napr. zriedením vodou z vodovodu.

Mazivo

25. Na mazanie valcov peristaltického čerpadla možno použiť glycerol alebo olivový olej: na trubice zo silikónového kaučuku sú vhodné obe mazivá.

Zásobné roztoky testovanej chemikálie

26. V prípade chemikálií s dostatočnou rozpustnosťou sa pripravia zásobné roztoky s vhodnými koncentráciami (napr. 1 – 5 g/l) v deionizovanej vode alebo v minerálnej časti syntetických médií. Pre nerozpustné chemikálie pozri dodatok 5 v kapitole C.10-A. Táto metóda nie je vhodná pre prchavé chemikálie bez úprav tubulárnych reaktorov (odsek 16). Určí sa DOC a TOC zásobného roztoku a merania sa opakujú pri každej novej dávke. Ak je rozdiel medzi DOC a TOC väčší ako 20 %, je potrebné skontrolovať rozpustnosť testovanej chemikálie vo vode. Porovná sa DOC alebo koncentrácia testovanej chemikálie nameraná špecifickou analýzou zásobného roztoku a nominálna hodnota, aby sa zistilo, či je výťažnosť dostatočná (zvyčajne možno

▼M4

očakávať > 90 %). Je potrebné sa uistiť, najmä pri disperziách, či sa DOC môže alebo nemôže použiť ako analytický parameter alebo či sa môže použiť iba analytická metóda špecifická pre testovanú chemikáliu. Pri disperziách sa vyžaduje odstredenie vzoriek. Pri každej novej dávke sa odmeria DOC, COD alebo testovaná chemikália pomocou špecifickej analýzy.

27. Určí sa pH zásobného roztoku. Z krajných hodnôt vyplýva, že pridanie chemikálie môže vplývať na pH aktivovaného kalu v testovacom systéme. V takom prípade je potrebné neutralizovať zásobný roztok na získanie pH 7 ± 0,5 pomocou malých množstiev anorganickej kyseliny alebo zásady, ale treba zabrániť zrážaniu testovanej chemikálie.

POSTUP

Príprava organického média na dávkovanie

28. Zabezpečí sa, aby boli všetky prítokové a výtokové nádoby a potrubia z prítokových nádob a do výtokových nádob dôkladne očistené, aby sa eliminovalo množenie mikróbov na začiatku a počas trvania testu.

29. Každý deň sa vhodným zriedením vodou z vodovodu čerstvo pripraví syntetické médium (odsek 23) buď z tuhých látok, alebo z koncentrovaného zásobného roztoku. Vo valci sa odmeria požadované množstvo, ktoré sa pridá do čistej prítokovej nádoby. V prípade potreby sa pred zriedením takisto pridá požadované množstvo zásobného roztoku testovanej chemikálie alebo referenčnej chemikálie do syntetického média. Ak je to vhodnejšie alebo potrebné na zabránenie straty testovanej chemikálie, pripraví sa zvlášť zriedený roztok testovanej chemikálie v samostatnej nádrži a pridá sa do naklonených trubíc prostredníctvom iného dávkovacieho čerpadla.

30. Prípadne (a podľa možnosti) sa použijú usadené domáce splaškové vody (odsek 24) čerstvo odobraté každý deň.

Činnosť rotujúcich tubulárnych reaktorov

31. Na hodnotenie jednej testovanej chemikálie sú potrebné dva identické tubulárne reaktory, ktoré sa umiestnia do miestnosti s konštantnou teplotou, zvyčajne 22 ± 2 °C.

32. Peristaltické čerpadlá sa nastavia tak, aby privádzali 250 ± 25 ml/h organického média (bez testovanej chemikálie) do naklonených trubíc, ktoré rotujú rýchlosťou 18 ± 2 rpm. Na trubice čerpadla sa na začiatku a pravidelne v priebehu testu aplikuje mazivo (odsek 25), aby sa zabezpečilo správne fungovanie a predĺžila sa životnosť trubíc.

33. Uhol sklonu trubíc sa prispôsobí horizontálnej úrovni, aby sa dosiahol čas zotrvania prívodu v čistej trubici 125 ± 12,5 sekúnd. Pridaním nebiologického markera (napr. NaCl, inertné farbivo) do prívodu sa odhadne retenčný čas: čas potrebný na dosiahnutie najvyššej koncentrácie vo výtoku sa použije ako stredný retenčný čas (keď je prítomný maximálny film, retenčný čas možno zvýšiť až na približne 30 min.).

34. Tieto miery, rýchlosti a časy sa určili s cieľom zabezpečiť primeranú elimináciu (> 80 %) DOC (alebo COD) a vytvoriť nitrifikované výtoky. Prietoková rýchlosť by sa mala zmeniť, ak je eliminácia nedostatočná alebo ak sa simuluje výkon konkrétnej čistiarne. V druhom prípade je potrebné prispôsobiť mieru dávkovania organického média, kým výkon reaktora nedosiahne výkon čistiarne.

▼M4

Inokulácia

35. Vzduchová inokulácia môže byť na začatie množenia mikroorganizmov dostatočná, ak sa použijú syntetické médiá, v iných prípadoch je však potrebné do prívodu pridávať 1 ml/l usadeného média počas troch dní.

Merania

36. V pravidelných intervaloch sa skontroluje, či sú miery dávok a rýchlosti rotácie v rozsahu požadovaných limitov. Takisto sa odmeria pH výtoku, najmä v prípade, že sa očakáva nitrifikácia.

Odber vzoriek a analýza

37. Metóda, spôsob a frekvencia odberu vzoriek sa zvolia tak, aby vyhovovali účelu testu. Napríklad sa zachytia vzorky prítoku a výtoku alebo sa zozbierajú vzorky v priebehu dlhšieho obdobia, napr. 3 – 6 h. V prvej fáze, bez testovanej chemikálie, sa vzorky odoberajú dvakrát týždenne. Vzorky sa filtrujú cez membrány alebo odstredivkou pri približne 40 000 m/s^2 počas približne 15 minút (odsek 18). Môže byť potrebné, aby sa vzorky pred membránovou filtráciou usadili a/alebo hrubo prefiltrovali. Určí sa DOC (alebo COD) aspoň v dvoch vyhodnoteniach a v prípade potreby BOD, amónium a dusitan/dusičnan.

38. Všetky analýzy by sa mali vykonať čo najskôr po odbere a príprave vzoriek. Ak sa analýzy musia odložiť, vzorky sa uskladnia v tme pri teplote približne 4 °C v plných, pevne uzavretých fľašiach. Ak musia byť vzorky uskladnené viac ako 48 hodín, zakonzervujú sa hlbokým zmrazením, acidifikáciou alebo pridaním vhodnej toxickej chemikálie (napr. 20 ml/l z 10 g/l roztoku chloridu ortutnatého). Je potrebné zabezpečiť, aby metóda konzervácie neovplyvnila výsledky analýzy.

Obdobie zábehu

39. V tomto období povrchový biofilm rastie, až kým nedosiahne optimálnu hrúbku, čo zvyčajne trvá približne dva týždne, ale nemalo by to trvať dlhšie ako šesť týždňov. Eliminácia (odsek 44) DOC (alebo COD) sa zvyšuje a dosiahne rovnovážnu úroveň. Keď sa dosiahne rovnováha pri podobnej hodnote v oboch trubiciach, vyberie sa jedna, ktorá bude slúžiť ako kontrolná počas zvyšku testu, v priebehu ktorého by ich výkon mal zostať konzistentný.

Zavedenie testovanej chemikálie

40. V tejto fáze sa do druhého reaktora pridá testovaná chemikália v požadovanej koncentrácii, zvyčajne 10 – 20 mg C/l. Kontrola pokračuje s cieľom získať samostatné organické médium.

Obdobie aklimatizácie

41. Dvakrát týždenne sa pokračuje v analýzach na zistenie DOC (alebo COD) a, ak sa hodnotí primárna biodegradovateľnosť, odmeria sa aj koncentrácia testovanej chemikálie prostredníctvom špecifickej analýzy. Po prvom zavedení testovanej chemikálie sa počká jeden až šesť týždňov (alebo v špeciálnych podmienkach dlhšie), aby sa umožnila aklimatizácia. Ak percentuálna eliminácia (odseky 43 – 45) dosiahne maximálnu hodnotu, získa sa 12 – 15 platných hodnôt v rovnovážnej fáze za obdobie približne troch týždňov na účely hodnotenia strednej percentuálnej eliminácie. Test sa považuje za ukončený, ak sa dosiahne dostatočne vysoký stupeň eliminácie. Po prvom pridaní testovanej chemikálie by test zvyčajne nemal trvať dlhšie ako 12 týždňov.

▼M4

Odlupovanie filmu

42. K náhlemu odstráneniu veľkých množstiev nadbytočného filmu z trubíc alebo k odlupovaniu dochádza v pomerne pravidelných intervaloch. S cieľom zabezpečiť, že to nebude mať vplyv na porovnateľnosť výsledkov, musia testy zahŕňať aspoň dva úplné cykly rastu a odlupovania.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

43. Vypočíta sa percentuálna eliminácia DOC alebo COD testovanej chemikálie pre každé časované hodnotenie pomocou rovnice:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

kde

D_t = percentuálna eliminácia DOC (alebo COD) v čase t,

C_s = koncentrácia DOC (alebo COD) v prítoku v dôsledku testovanej chemikálie, podľa možnosti odhadnutá z koncentrácie v zásobnom roztoku a pridaného objemu zásobného roztoku (mg/l),

E = nameraná hodnota DOC (alebo COD) v testovacom výtoku v čase t (mg/l),

E_o = nameraná hodnota DOC (alebo COD) v kontrolnom výtoku v čase t (mg/l).

Výpočet sa zopakuje pri referenčnej chemikálii, pokiaľ sa testuje.

Činnosť kontrolného reaktora

44. Stupeň eliminácie DOC (alebo COD) (D_B) organického média v kontrolných reaktoroch je informácia užitočná pri hodnotení biodegradačnej činnosti biofilmu počas testu. Vypočíta sa percentuálna eliminácia z rovnice:

$$D_B = 100(1 - E_o/C_m)\%$$

kde

C_m = DOC (alebo COD) organického média v kontrolnom prítoku (mg/l).

45. Vypočíta sa eliminácia (D_{ST}) testovanej chemikálie, ak je meraná špecifickou analytickou metódou, pri každom časovom hodnotení z rovnice:

$$DST = 100(1 - S_e/S_i)\%$$

kde

S_i = nameraná alebo podľa možnosti odhadnutá koncentrácia testovanej chemikálie v testovacom prítoku (mg/l),

S_e = nameraná koncentrácia testovanej chemikálie v testovacom výtoku v čase t (mg/l).

▼M4

Ak sa analytickou metódou získaná pozitívna hodnota v neupravených splaškových vodách rovná S_c mg/l, percentuálna eliminácia (D_{SC}) sa vypočíta podľa vzorca:

$$DSC = 100(S_i - S_e + S_c)/(S_i + S_c)\%$$

Vyjadrenie výsledkov testu

46. Zakreslí sa percentuálna eliminácia D_t a D_{ST} (alebo D_{SC}), ak je k dispozícii, v závislosti od času (pozri dodatok 2 v kapitole C.10-A). Zoberie sa stredná (vyjadrená ako najbližšie celé číslo) a smerodajná odchýlka 12 – 15 hodnôt pre D_T (a pre D_{ST}, ak je k dispozícii) získaná v rovnovážnej fáze ako percentuálna eliminácia testovanej chemikálie. Z tvaru krivky eliminácie možno vyvodiť niekoľko záverov o procesoch odstraňovania.

Adsorpcia

47. Ak sa na začiatku testu pozoruje vysoká eliminácia DOC testovanej chemikálie, testovaná chemikália je pravdepodobne eliminovaná adsorpciou na biofilme. To možno dokázať určením adsorbovanej testovanej chemikálie na tuhých látkach odlúpnutých z filmu. Eliminácia DOC adsorbovateľných chemikálií zvyčajne neostáva vysoká počas celého testu. Bežne sa na začiatku vyskytne vysoký stupeň eliminácie, ktorý postupne klesá na rovnovážnu hodnotu. Ak by však adsorbovaná testovaná chemikália bola schopná spôsobiť aklimatizáciu populácie mikróbov, eliminácia DOC testovanej chemikálie by následne stúpla a dosiahla by hornú rovnovážnu úroveň.

Lag fáza

48. Podobne ako pri statických skríningových testoch si mnohé testované chemikálie vyžadujú pred úplnou biodegradáciou lag fázu. Počas lag fázy prebieha aklimatizácia alebo adaptácia príslušných baktérií pri takmer nulovej eliminácii testovanej chemikálie. Potom nastane počiatočné množenie týchto baktérií. Táto fáza sa končí a degradačná fáza sa svojvoľne začína, keď sa odstráni približne 10 % počiatočného množstva testovanej chemikálie (po umožnení adsorpcie, ak k nej dochádza). Lag fáza je často veľmi variabilná a slabo reprodukovateľná.

Rovnovážna fáza

49. Rovnovážna fáza krivky eliminácie v nepretržitom teste je vymedzená ako fáza, v ktorej nastáva maximálna degradácia. Táto fáza by mala trvať najmenej tri týždne a mala by mať približne 12 – 15 nameraných platných hodnôt.

Stredný stupeň eliminácie testovanej chemikálie

50. Vypočíta sa stredná hodnota z hodnôt eliminácie D_t (a D_{st}, ak je dostupná) testovanej chemikálie počas rovnovážnej fázy. Hodnota zaokrúhlená na celé číslo (1 %) predstavuje stupeň eliminácie testovanej chemikálie. Odporúča sa aj vypočítať 95 % interval spoľahlivosti strednej hodnoty. Podobným spôsobom sa vypočíta stredný stupeň (D_B) eliminácie organického média v kontrolnej nádobe.

▼M4

Indikácia biodegradácie

51. Ak testovaná chemikália výrazne neadsorbuje na biofilme a krivka eliminácie má typický tvar biodegradačnej krivky s lag, degradačnou a rovnovážnou fázou (odseky 48, 49), nameraná eliminácia sa môže s istotou pripísať biodegradácii. Ak bola počiatočná eliminácia vysoká, simulačný test nemôže rozlišovať medzi biologickými a abiotickými eliminačnými procesmi. V takých prípadoch a v prípade akýchkoľvek pochybností o biodegradácii (napr. ak dochádza k stripovaniu) sa vykoná analýza adsorbovanej testovanej chemikálie na vzorkách filmu alebo ďalšie statické (skríningové) testy biodegradovateľnosti založené na parametroch, ktoré jednoznačne indikujú biologické procesy. Takými testmi sú metódy absorpcie kyslíka (kapitola C.4 tejto prílohy D, E a F) (9) alebo test, v ktorom sa meria tvorba CO_2 (kapitola C.4-C tejto prílohy alebo metóda uzavretého priestoru nad kvapalinou) (10). Ako inokulum sa použije predexponovaný biofilm z príslušného reaktora.

52. Ak sa odmerala eliminácia DOC aj eliminácia špecifickej chemikálie, výrazné rozdiely (v prípade prvej hodnoty nižšej ako druhej) medzi percentuálnou elimináciou indikujú prítomnosť organických medziproduktov, ktoré sa môžu rozkladať ťažšie. Tieto medziprodukty treba preskúmať.

Platnosť výsledkov testu

53. Test možno považovať za platný, ak po dvoch týždňoch prevádzky stupeň elimínácie DOC (alebo COD) (D_B) v kontrolných jednotkách je > 80 % a nie sú pozorované žiadne nezvyčajné javy.

54. Ak sa testovala ľahko biodegradovateľná (referenčná) chemikália, stupeň biodegradácie by mal byť > 90 % a rozdiel medzi hodnotami duplikátov by nemal byť väčší ako 5 %. Ak nie sú splnené tieto dve kritériá, je potrebné skontrolovať experimentálne postupy a/alebo získať domáce splaškové vody z iného zdroja.

55. Podobne rozdiely medzi hodnotami biodegradácie z duplicitných jednotiek (ak sa použili), v ktorých sa spracúva testovaná chemikália, by sa nemali líšiť o viac ako 5 %. Ak toto kritérium nie je splnené, ale eliminácia je vysoká, v analýze sa pokračuje ďalšie tri týždne. Ak je eliminácia nízka, preskúmajú sa inhibičné účinky testovanej chemikálie, pokiaľ nie sú známe, a test sa podľa možnosti zopakuje pri nižšej koncentrácii testovanej chemikálie.

Správa o teste

56. Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— identifikačné údaje,

— fyzikálny charakter a významné fyzikálno-chemické vlastnosti.

Podmienky testovania:

— všetky modifikácie testovacieho systému, najmä ak sa testujú nerozpustné alebo prchavé látky,

— druh organického média,

— podiel a charakter priemyselného odpadu prítomného v splaškových vodách, ak sa použije a je známy,

— metóda inokulácie,

▼M4

— zásobný roztok testovanej chemikálie – obsah DOC (rozpustený organický uhlík) a TOC (celkový organický uhlík), spôsob prípravy v prípade suspendovania, použitá testovacia koncentrácia, odôvodnenie v prípade hodnôt mimo rozsahu 10 – 20 mg/l DOC, metóda pridávania, dátum prvého pridania, všetky zmeny koncentrácie,

— stredný hydraulický retenčný čas (bez rastu), rotačná rýchlosť trubice, približný uhol sklonu, ak je to možné,

— údaje o odlupovaní, čas a intenzita,

— testovacia teplota a rozsah,

— použité analytické metódy.

Výsledky testu:

— všetky namerané údaje DOC, COD, špecifické analýzy, pH, teplota, N chemikálie v prípade potreby,

— všetky vypočítané hodnoty D_t (alebo D_{tc}), D_B, D_s v tabuľkovej podobe a krivky eliminácie,

— informácie o lag a rovnovážnej fáze, trvanie testu, stupeň eliminácie testovanej chemikálie, referenčnej chemikálie (ak sa testovala) a organického média (v kontrolnej jednotke) spolu so štatistickými údajmi a vyjadreniami biodegradovateľnosti a platnosťou testu,

— rozbor výsledkov.

LITERATÚRA

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, G. A., Jones, K., Vandyke, K. G. (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., a Benz, M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214 – 220.

4. Gloyna, E. F., Comstock, R. F., Renn, C. E. (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355 – 1357.

5. Kumke, G. W., Renn, C. E. (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92 – 94.

6. Tomlinson, T. G., Snaddon, D. H. M. (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, Londýn.

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, Londýn.

9. Kapitola C.4 tejto prílohy, Stanovenie „ľahkej" biodegradovateľnosti A – F.

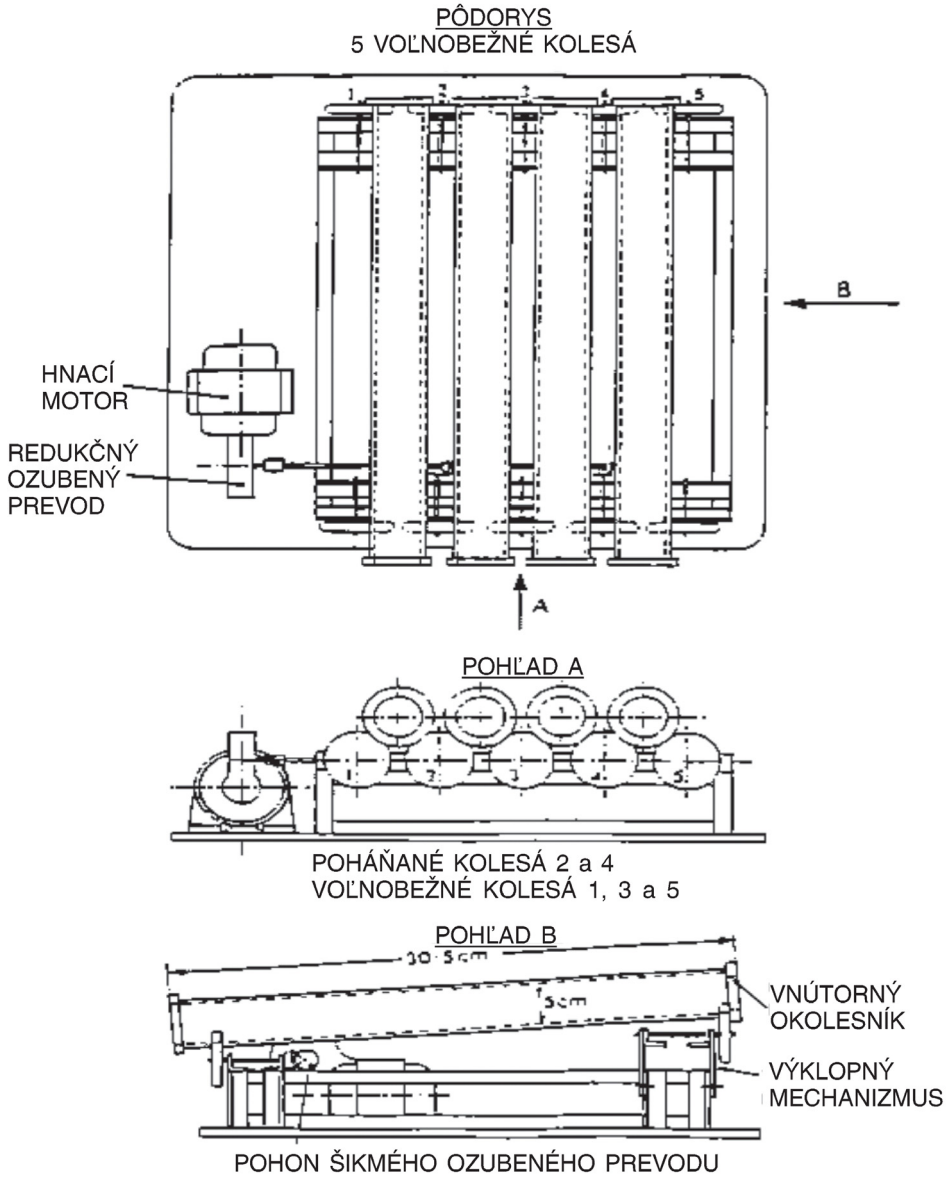
10. ISO 14593 (1998) Kvalita vody. Hodnotenie úplnej aeróbnej biodegradability organických látok vo vodnom prostredí. Metóda analýzy uvoľneného anorganického uhlíka v uzavretých nádobách.

▼M4

Dodatok 8

Obrázok 1

Rotujúce trubice



Glosár:

Pôdorys:

Pohľad A/B:

Poháňané kolesá:

Voľnobežné kolesá:

Hnací motor:

Redukčný ozubený prevod:

Vnútorný okolesník:

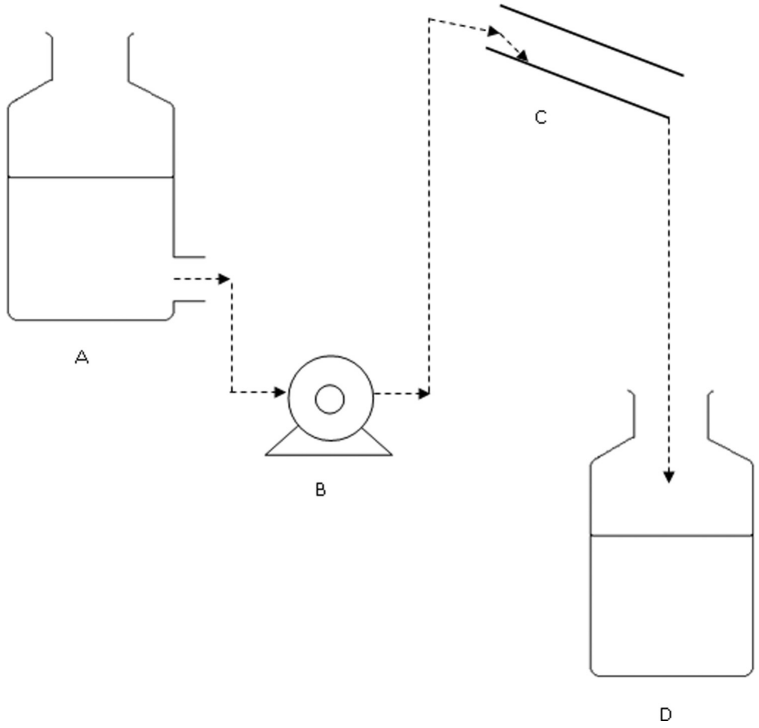
Výklopný mechanizmus:

Pohon šikmého ozubeného prevodu:

▼**M4**

Obrázok 2

Postupový diagram



A: Prívodná nádrž

B: Peristaltické čerpadlo

C: Rotujúca trubica

D: Nádoba na zber výtoku

VYMEDZENIE POJMOV:

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Chemikálie: „Treba poznamenať, že pojem chemikálie má rozsiahle použitie v dohodách UNCED a neskorších dokumentoch na označenie látok, produktov, zmesí, prípravkov alebo akýchkoľvek iných pojmov, ktoré sa môžu používať v existujúcich systémoch, na vymedzenie rozsahu“.

▼M6

C.11. AKTIVOVANÝ KAL, TEST RESPIRAČNEJ INHIBÍCIE (OXIDÁCIA UHLÍKA A AMÓNNYCH IÓNOV)

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 209 (2010). Táto testovacia metóda opisuje metódu stanovenia účinkov chemikálie na mikroorganizmy z aktivovaného kalu (väčšinou baktérie) meraním ich rýchlosti spotreby kyslíka (oxidácie uhlíka a/alebo amónnych iónov) v definovaných podmienkach a v prítomnosti rozličných koncentrácií testovanej chemikálie. Testovacia metóda je založená na teste ETAD (ekologické a toxikologické združenie odvetvia výroby farbív) (1) (2), na predchádzajúcom usmernení OECD TG 209 (3) a na revidovanej norme ISO 8192 (4). Účelom tohto testu je poskytnúť metódu rýchleho skríningu na posúdenie účinkov chemikálií na mikroorganizmy aktivovaného kalu z biologického (aeróbneho) stupňa čistiarní odpadových vôd. Výsledky testu môžu slúžiť aj ako ukazovateľ vhodných neinhibičných koncentrácií testovaných chemikálií použiteľných v testoch biodegradovateľnosti (napr. kapitoly C.4 A – F, C.9, C.10, C.12 a C.29 tejto prílohy, OECD TG 302 C). V tomto prípade sa test môže vykonať ako skríningový test, podobne ako test na vyhľadávanie rozsahu alebo limitný test (pozri bod 39), pričom sa berie do úvahy iba celková respirácia. Tieto informácie by sa však mali posudzovať opatrne v prípade testov ľahkej biodegradovateľnosti (kapitola C.4 A – F a C.29 tejto prílohy), pre ktoré je koncentrácia inokula výrazne nižšia než koncentrácia používaná v tejto testovacej metóde. Nedostatočná inhibícia v tomto respiračnom teste však neznamená automaticky neinhibičné podmienky testu ľahkej biodegradovateľnosti podľa kapitoly C.4 A – F alebo C.29 tejto prílohy.

2. Celkovo sa zdá, že test respiračnej inhibície sa od prvého publikovania úspešne používa, no v niektorých prípadoch boli zaznamenané nesprávne výsledky, napríklad (2) (4) (5). Respiračné krivky súvisiace s koncentráciou sú niekedy dvojfázové, diagramy vzťahu medzi dávkou a reakciou skreslené a hodnoty EC_{50} nečakane nízke (5). Prešetrovania ukázali, že takéto výsledky sa dosahujú, ak použitý aktivovaný kal výrazne nitrifikuje a testovaná chemikália má väčší účinok na oxidáciu amónnych iónov ako na všeobecnú heterotrofnú oxidáciu. Preto je možné tieto nesprávne výsledky prekonať vykonaním doplnkových testov použitím špecifického inhibítora nitrifikácie. Na základe merania miery spotreby kyslíka v prítomnosti a v neprítomnosti takého inhibítora, napríklad *N*-alylthomočoviny (ATU), sa môžu osobitne vypočítať miery celkovej, heterotrofnej a nitrifikačnej spotreby kyslíka (4) (7) (8). Umožní to stanoviť inhibičné účinky testovanej chemikálie na tieto dva procesy a vypočítať hodnoty EC_{50} tak pre oxidáciu organického uhlíka (heterotrofnú), ako aj amónnych iónov (nitrifikáciu) zvyčajným spôsobom. Je potrebné si uvedomiť, že v niektorých zriedkavých prípadoch môže byť inhibičný účinok *N*-alyltiomočoviny čiastočne alebo úplne anulovaný v dôsledku vytvárania komplexov s testovanými chemikáliami alebo doplnkami média, napríklad iónmi Cu^{++} (6). Ióny Cu^{++} sú nevyhnutné pre baktérie *Nitrosomonas*, no vo vyššej koncentrácii sú toxické.

3. Potreba nitrifikácie v aeróbnom čistení odpadových vôd ako nevyhnutný krok v procese odstraňovania zlúčenín dusíka z odpadových vôd denitrifikáciou na plynné produkty, sa stala naliehavou najmä v európskych krajinách. EÚ stanovila dolné limity koncentrácie dusíka vo vyčistených výtokoch vypúšťaných do zberných vôd ([1]).

([1]) Smernica Rady 91/271/EHS z 21. mája 1991 o čistení komunálnych odpadových vôd. Ú. v. ES L 135, 30.5.1991, s. 40.

▼**M6**

4. Na väčšinu účelov postačuje samotná metóda posúdenia účinku na procesy oxidácie organického uhlíka. V niektorých prípadoch je však na interpretáciu výsledkov a pochopenie účinkov potrebné preskúmanie účinku na samotnú nitrifikáciu, alebo na nitrifikáciu a oxidáciu organického uhlíka zvlášť.

PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

5. Rýchlosť spotreby kyslíka aktivovaného kalu vyživovaného syntetickou odpadovou vodou sa meria v uzavretej komore obsahujúcej kyslíkovú elektródu po kontaktnom čase 3 hodiny. So zreteľom na reálny expozičný scenár by vyhovovali dlhšie kontaktné časy. Ak testovaná chemikália rýchlo degraduje, napríklad abioticky prostredníctvom hydrolýzy, alebo je prchavá a koncentráciu nie je možné primerane udržiavať, je možné použiť kratší čas expozície napr. 30 minút. Citlivosť každej dávky aktivovaného kalu by sa mala v deň expozície overiť pomocou vhodnej referenčnej chemikálie. Test sa spravidla používa na stanovenie koncentrácie EC_x (napr. EC_{50}) testovanej chemikálie a/alebo koncentrácie bez pozorovaného účinku (NOEC).

6. Inhibícia spotreby kyslíka mikroorganizmami oxidujúcimi organický uhlík sa môže osobitne vyjadriť zo spotreby kyslíka mikroorganizmami oxidujúcimi amónne ióny meraním rýchlostí spotreby kyslíka v prítomnosti i neprítomnosti *N*-alyltiomočoviny – špecifického inhibítora oxidácie amónnych iónov na dusitany primárnymi nitrifikačnými baktériami. V tomto prípade sa percentuálna inhibícia rýchlosti spotreby kyslíka vypočíta porovnaním rýchlosti spotreby kyslíka v prítomnosti testovanej chemikálie so strednou hodnotou spotreby kyslíka zodpovedajúcich kontrolných vzoriek neobsahujúcich testovanú chemikáliu, a to tak v prítomnosti, ako aj v neprítomnosti špecifického inhibítora *N*-alyltiomočoviny.

7. Akákoľvek spotreba kyslíka vyplývajúca z abiotických procesov sa môže zistiť stanovením miery spotreby v zmesiach testovanej chemikálie, syntetickej odpadovej vody a vody, bez aktivovaného kalu.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

8. Na to, aby bolo možné správne interpretovať výsledky, mala by byť známa identifikácia testovanej chemikálie (najlepšie číslo CAS), jej názov (IUPAC), čistota, rozpustnosť vo vode, tlak pary, prchavosť a adsorpčné vlastnosti. Prchavé látky spravidla nie je možné primerane testovať, pokiaľ sa neprijmú osobitné opatrenia (pozri bod 21).

POUŽITEĽNOSŤ TESTOVACEJ METÓDY

9. Testovacia metóda sa môže použiť na chemikálie rozpustné vo vode, slabo rozpustné a prchavé. Nie vždy je však možné získať hodnoty EC_{50} v prípade látok s obmedzenou rozpustnosťou a platné výsledky v prípade prchavých látok je možné dosiahnuť len tak, že časť (napr. > 80 %) testovanej chemikálie zostane v reakčnej zmesi na konci expozičného času, resp. časov. Ak existuje akákoľvek neistota týkajúca sa stability testovanej chemikálie alebo jej prchavosti, mali by sa na spresnenie koncentrácie EC_x predložiť doplňujúce podporné analytické údaje.

▼M6

REFERENČNÉ CHEMIKÁLIE

10. Referenčné chemikálie by sa mali pravidelne testovať s cieľom zabezpečiť, aby boli testovacia metóda a testovacie podmienky spoľahlivé a skontrolovať citlivosť každej dávky aktivovaného kalu, ktorý sa používa ako mikrobiálne inokulum, v deň expozície. Ako referenčná inhibičná látka sa odporúča 3,5-dichlórfenol (3,5-DCP), keďže ide o známy inhibítor respirácie, ktorý sa používa na mnohé typy testov inhibície/toxicity (4). Ako referenčná chemikália pre test inhibície celkovej respirácie sa môže použiť aj pentahydrát síranu meďnatého (9). Ako osobitný referenčný inhibítor nitrifikácie je možné použiť *N*-metylanilín (4).

KRITÉRIÁ PLATNOSTI A REPRODUKOVATEĽNOSŤ

11. Rchlosť spotreby kyslíka slepými kontrolnými vzorkami (bez testovanej alebo referenčnej chemikálie) by nemala byť nižšia ako 20 mg kyslíka na gram aktivovaného kalu (sušiny suspendovaných tuhých látok) za hodinu. Ak je táto miera nižšia, test by sa mal zopakovať s premytým aktivovaným kalom alebo s kalom z iného zdroja. Variačný koeficient rýchlosti spotreby kyslíka v kontrolných replikátoch by nemal byť vyšší ako 30 % na konci konečného testu.

12. V rámci medzinárodnej porovnávacej skúšky, ktorú v roku 2004 zorganizovala Medzinárodná organizácia pre normalizáciu ISO (4) s použitím aktivovaného kalu získaného z odpadových vôd z domácností, sa zistilo, že hodnoty EC_{50} látky 3,5-DCP sú v rozsahu od 2 do 25 mg/l pre celkovú respiráciu, 5 až 40 mg/l pre heterotrofnú respiráciu a 0,1 až 10 mg/l pre nitrifikačnú respiráciu. Ak hodnota EC_{50} látky 3,5-DCP neleží v očakávanom rozsahu, test by sa mal zopakovať s aktivovaným kalom z iného zdroja. Hodnota EC_{50} pentahydrátu síranu meďnatého by mala byť v rozsahu od 53 do 155 mg/l pre celkovú respiráciu (9).

OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Testovacie nádoby a zariadenie

13. Používať by sa malo bežné laboratórne zariadenie a toto vybavenie:

a) testovacie nádoby – napríklad 1 000 ml kadičky obsahujúce 500 ml reakčnej zmesi (pozri bod 5 na obrázku 1);

b) komora s príslušenstvom na meranie koncentrácie rozpusteného kyslíka; vhodná kyslíková elektróda; uzavretá komora obsahujúca vzorku, bez voľného priestoru a s registračným prístrojom (napr. body 7, 8, 9 na obrázku 1 v dodatku 2); alternatívne sa môže použiť BOD fľaša s vhodným manžetovým adaptérom na upevnenie kyslíkovej elektródy na hrdlo fľaše (obrázok 2 v dodatku 3). S cieľom zabrániť strate kvapaliny odobratej pri vložení kyslíkovej elektródy je vhodné najskôr vložiť cez manžetu lievik alebo sklenenú trubicu, alebo použiť nádoby so žliabkovou obrubou. V obidvoch prípadoch by sa malo použiť magnetické miešadlo alebo alternatívna metóda miešania, napríklad sonda s automatickým miešaním;

c) magnetické miešadlá a snímače pokryté inertným materiálom, na použitie v meracej komore a/alebo v testovacích nádobách;

d) prevzdušňovacie zariadenie: v prípade potreby by sa mal vháňať stlačený vzduch cez vhodný filter na odstránenie prachu a oleja a cez premývacie fľaše s vodou na zvlhčovanie vzduchu. Obsah nádob by sa mal prevzdušňovať Pasteurovými pipetami alebo inými prevzdušňovacími zariadeniami, ktoré neadsorbujú chemikálie. Na zabezpečenie spotreby kyslíka pre kal a prekonanie ťažkostí s chemikáliami, ktoré produkujú nadmerné množstvo peny, sú prchavé, a tým vytvárajú straty, alebo sa

▼**M6**

ťažko rozptyľujú pri prevzdušňovaní vháňaním vzduchu, sa môže použiť orbitálna trepačka s prevádzkovou rýchlosťou rotácie 150 – 250 ot/min a s bankami s objemom napríklad 2 000 ml. Testovací systém tvoria spravidla viaceré kadičky, ktoré sa sústavne prevzdušňujú a postupne používajú (napr. v intervaloch približne 10 – 15 minút), a potom sa postupne analyzujú. Použiť sa môžu aj schválené zariadenia, ktoré umožňujú súčasné prevdzušňovanie a meranie rýchlosti spotreby kyslíka v zmesiach;

e) pH-meter;

f) odstredivka, spravidla stolná odstredivka na kal s odstredivým zrýchlením 10 000 m/s^2.

Reagenty

14. Používať by sa mali výlučne reagenty analytickej čistoty.

Voda

15. Používať by sa mala destilovaná alebo deionizovaná voda obsahujúca menej ako 1 mg/l rozpusteného organického uhlíka (DOC), s výnimkou prípadov, keď sa vyžaduje voda z vodovodu bez chlóru.

Zdroj syntetickej odpadovej vody

16. Médium by sa malo pripraviť tak, aby obsahovalo tieto zložky v uvedených množstvách:

— peptón	16 g
— mäsový extrakt (alebo porovnateľný zeleninový extrakt)	11 g
— močovina	3 g
— chlorid sodný (NaCl)	0,7 g
— dihydrát chloridu vápenatého ($CaC1_2$, $2H_2O$)	0,4 g
— heptahydrát síranu horečnatého ($MgSO_4$, $7H_2O$)	0,2 g
— hydrogénfosforečnan didraselný bezvodý (K_2HPO_4)	2. 8 g
— destilovaná alebo deionizovaná voda na 1 liter.	

17. Hodnota pH tohto roztoku by mala byť 7,5 ± 0,5. Ak sa pripravené médium nepoužije okamžite, malo by sa skladovať na tmavom mieste pri teplote 0 – 4 °C, nie dlhšie ako jeden týždeň, alebo za podmienok, ktoré nemenia jeho zloženie. Je potrebné si uvedomiť, že táto odpadová voda má stonásobne vyššiu koncentráciu, než je opísané v Technickej správe OECD: „*Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents*“ (Navrhnuté metódy stanovovania biodegradovateľnosti surfaktantov používaných v syntetických detergentoch, 11. jún 1976) a navyše s pridaným hydrogénfosforečnanom didraselným.

▼M6

18. Alternatívne sa zložky média môžu pred uskladnením jednotlivo sterilizovať, prípadne sa peptón a mäsový extrakt môžu pridať krátko pred vykonaním testu. Pred použitím by sa médium malo dôkladne premiešať a jeho pH v prípade potreby upraviť na hodnotu 7,5 ± 0,5.

Testovaná chemikália

19. Pre testované látky ľahko rozpustné vo vode by sa mal pripraviť zásobný roztok iba do maximálnej rozpustnosti vo vode (zrážania nie sú prípustné). Látky slabo rozpustné vo vode, zmesi so zložkami s rôznou rozpustnosťou vo vode a adsorpčné látky by sa mali odvážiť priamo do testovacích nádob. V týchto prípadoch môže byť alternatívou použitie zásobných roztokov, ak sa analyticky stanovia koncentrácie rozpustených testovaných chemikálií v testovacích nádobách (pred pridaním aktivovaného kalu). Analytické stanovenie koncentrácií rozpustených testovaných chemikálií v testovacích nádobách je dôležité aj v prípade, že sa majú pripraviť vode prispôsobené frakcie (*water accommodated fraction* – WAF). Vyhnúť sa treba použitiu organických rozpúšťadiel, dispergačných činidiel/emulgátorov na zlepšenie rozpustnosti. Použitie ultrazvuku v prípade zásobných roztokov a suspenzií pred miešaním, napríklad počas noci, je možné vtedy, ak sú k dispozícii primerané informácie týkajúce sa stability testovanej látky za takýchto podmienok.

20. Testovaná chemikália môže nepriaznivo ovplyvniť pH v testovacom systéme. Hodnota pH zmesí s aplikovanou testovanou chemikáliou by sa mala stanoviť predbežnou skúškou pred začiatkom testu, aby sa zistilo, či bude potrebná úprava pH pred hlavným testom a potom opäť v deň hlavného testu. V prípade potreby by sa mali roztoky/suspenzie testovanej látky vo vode neutralizovať pred pridaním inokula. Keďže však neutralizácia môže zmeniť chemické vlastnosti chemikálie, v závislosti od účelov štúdie je možné vykonať ďalšie testovanie na posúdenie účinku testovanej chemikálie na kal bez úpravy pH.

21. Toxické účinky prchavých chemikálií, najmä pri testoch, v rámci ktorých sa vzduch nechá prebublávať cez systém, môžu mať premenlivú úroveň, k čomu dochádza v dôsledku strát látky počas expozície. V prípade takýchto látok by sa malo postupovať obozretne a mali by sa vykonávať osobitné analýzy kontrolných zmesí obsahujúcich danú látku a úpravy režimu prevzdušňovania.

Referenčná chemikália

22. Ak sa ako referenčná chemikália používa 3,5-dichlórfenol, je potrebné pripraviť roztok 1 g 3,5-dichlórfenolu v 1 000 ml vody (15). Na urýchlenie rozpúšťania by sa mala použiť teplá voda a/alebo pôsobenie ultrazvuku a po ochladení na izbovú teplotu sa roztok doplní na príslušný objem. Je však potrebné zabezpečiť, aby sa referenčná látka štrukturálne nezmenila. Hodnota pH roztoku by sa mala prekontrolovať a v prípade potreby upraviť pomocou NaOH alebo H_2SO_4 na pH 7 – 8.

23. Ak sa ako referenčná chemikália používa pentahydrát síranu meďnatého, pripravia sa koncentrácie 58 mg/l, 100 mg/l a 180 mg/l (faktor 1,8). Látka sa odváži priamo do testovacích nádob (29 – 50 – 90 mg na 500 ml celkového objemu). Potom sa rozpustí v 234 ml vody z vodovodu ošetrenej v autokláve. Pentahydrát síranu meďnatého je ľahko rozpustný. Na začiatku testu sa pridá 16 ml syntetického odpadovej vody a 250 ml aktivovaného kalu.

▼M6

Osobitný inhibítor nitrifikácie

24. Pripraviť by sa mal zásobný roztok 2,32 g/l *N*-alyltiomočoviny (ATM). Pridaním 2,5 ml tohto zásobného roztoku do inkubačnej zmesi s konečným objemom 500 ml sa dosiahne konečná koncentrácia 11,6 mg ATM/l (10^{-4} mol/l), ktorá je preukázateľne dostatočná (4) na to, aby spôsobila 100 % inhibíciu nitrifikácie aktivovaného kalu s obsahom 1,5 g/l suspendovaných tuhých látok.

Abiotické kontrolné vzorky

25. Za určitých výnimočných podmienok môže testovaná chemikália so silne redukčnými vlastnosťami spôsobiť merateľnú abiotickú spotrebu kyslíka. V takých prípadoch sú potrebné abiotické kontrolné vzorky, aby sa rozlišovalo medzi abiotickou spotrebou kyslíka v prípade testovanej látky a mikrobiálnou respiráciou. Abiotické kontrolné vzorky sa môžu pripraviť vynechaním inokula z testovacej zmesi. Podobne sa môžu abiotické kontrolné vzorky bez inokula použiť na vykonanie podporných analytických meraní na účely stanovenia dosiahnutej koncentrácie počas expozičnej fázy testu napr. pri používaní zásobných roztokov chemikálií zle rozpustných vo vode, ktorých zložky majú rôznu rozpustnosť vo vode. V osobitných prípadoch môže byť potrebné pripraviť abiotickú kontrolnú vzorku so sterilizovaným inokulom (napr. pomocou autoklávu alebo pridaním sterilizujúcich toxických látok). Niektoré chemikálie môžu produkovať alebo spotrebúvať kyslík, len ak je povrchová plocha dostatočne veľká na reakciu, a to aj v prípade, že za normálnych okolností na to potrebujú oveľa vyššie hodnoty teploty a tlaku. Osobitná pozornosť by sa v tejto súvislosti mala venovať látkam peroxidovej skupiny. Sterilizované inokulum poskytuje veľkú povrchovú plochu.

Inokulum

26. Na všeobecné použitie by sa mal aktivovaný kal odoberať z miesta výstupu prevzdušňovacej nádrže alebo z miesta v blízkosti výstupu nádrže správne pracujúcej čistiarne odpadových vôd, ktorá spracováva prevažne odpadové vody z domácností. V závislosti od účelu testu sa pri vhodnej koncentrácii suspendovaných tuhých látok od 2 do 4 g/l môžu použiť aj iné vhodné druhy alebo zdroje aktivovaného kalu, napríklad kal kultivovaný v laboratóriu. Kaly z rôznych čistiarní odpadových vôd však môžu vykazovať rôzne vlastnosti a rôznu citlivosť.

27. Kal sa môže používať v stave, v akom sa odoberie, no hrubé častice by sa mali odstrániť krátkodobým usadzovaním, napríklad 5 – 15 minút, a následným odliatím vrchnej vrstvy jemnejších tuhých častíc, alebo preosievaním (napr. sitom s veľkosťou otvorov 1 mm^2). Alternatívne sa kal môže homogenizovať v miešadle približne 15 sekúnd alebo dlhšie.Potrebná je však opatrnosť, pokiaľ ide o použitú silu a o zmenu teploty, ktorá by mohla nastať počas dlhého miešania.

28. Často je potrebné premývanie kalu, napríklad ak je rýchlosť endogénej spotreby kyslíka nízka. Kal by sa mal najskôr odstreďovať v čase potrebnom na vytvorenie čistého supernatantu a pelety tuhých látok z odpadovej vody, napríklad 10 minút pri odstredivom zrýchlení približne 10 000 m/s^2. Supernatant by sa mal odstrániť a kal resuspendovať vo vode z vodovodu bez chlóru, pri súčasnom pretrepávaní, pričom premývacia voda by sa mala následne odstrániť opätovným odstreďovaním. Proces premývania a odstreďovania by sa mal v prípade potreby opakovať. Stanoviť by sa mala suchá hmotnosť známeho objemu resuspendovaného kalu a kal by sa mal koncentrovať odstránením kvapaliny alebo ďalej riediť vo vode z vodovodu bez chlóru, aby sa dosiahla požadovaná koncentrácia tuhých

▼M6

látok kalu 3 g/l. Aktivovaný kal by sa mal nepretržite prevzdušňovať (napr. prietokom 2 l/minútu) pri testovacej teplote, a ak je to možné, použiť v deň odberu. Ak to nie je možné, kal by sa mal v priebehu nasledujúcich dvoch dní denne vyživovať zdrojom syntetickej odpadovej vody (50 ml zdroja syntetickej odpadovej vody/liter aktivovaného kalu). Kal sa potom použije na test a výsledky sa považujú za platné za predpokladu, že nenastali žiadne výrazné zmeny v jeho aktivite z hľadiska rýchlosti endogénnej heterotrofnej a nitrifikačnej spotreby kyslíka.

29. Ťažkosti môžu vzniknúť, ak počas inkubácie dochádza k peneniu do takej miery, že pena a tuhé látky kalu, ktoré sa na nej nesú, sú vytláčané z prevzdušňovacích nádob. Penenie môže byť niekedy spôsobené prítomnosťou syntetickej odpadovej vody, no s penením treba počítať, ak je testovaná chemikália povrchovo aktívnou látkou, alebo povrchovo aktívnu látku obsahuje. Strata tuhých látok v kale z testovaných zmesí povedie k umelo zníženým rýchlostiam spotreby kyslíka, čo by sa mohlo nesprávne vykladať ako výsledok inhibície. Prevzdušňovaním roztoku povrchovo aktívnej látky sa navyše povrchovo aktívna látka koncentruje vo vrstve peny a stratou peny z testovacieho systému sa znížia expozičné koncentrácie. Penenie je možné kontrolovať jednoduchými mechanickými metódami (napr. občasným ručným miešaním pomocou sklenenej tyčinky) alebo pridaním emulzie silikónového protipenového činidla bez obsahu povrchovo aktívnej látky a/alebo použitím metódy prevdzušňovania trepačkovej banky. Ak problém súvisí s prítomnosťou syntetickej odpadovej vody, malo by sa upraviť jej zloženie použitím protipenového činidla v pomere napríklad 50 µl/liter. Ak penenie spôsobuje testovaná chemikália, množstvo potrebné na zníženie tohto účinku by sa malo stanoviť pri najvyššej testovacej koncentrácii. Potom by sa mali rovnako ošetriť všetky jednotlivé prevzdušňovacie nádoby (vrátane tých nádob, napríklad slepých kontrolných a referenčných nádob, v ktorých sa pena netvorí). Ak sa používajú protipenové činidlá, nemalo by dochádzať k žiadnej interakcii s inokulom a/alebo testovanou chemikáliou.

POSTUP SKÚŠKY

30. Stanoviť sa môže inhibícia troch rôznych druhov spotreby kyslíka, celkovej, iba heterotrofnej a spotreby v dôsledku nitrifikácie. Za normálnych okolností by malo postačovať meranie inhibície celkovej spotreby kyslíka. Účinky oxidácie organického uhlíka a oxidácie amónnych solí na heterotrofnú spotrebu kyslíka sú potrebné v prípade, že existuje osobitná požiadavka na tieto dva samostatné parametre pre konkrétnu chemikáliu, alebo (ako alternatíva) ak je potrebné objasniť atypické krivky závislosti odozvy od dávky na základe inhibície celkovej spotreby kyslíka.

Podmienky testu

31. Test by sa mal vykonávať pri teplote v rozsahu 20 ± 2 °C.

Testovacie zmesi

32. Testovacie zmesi (F_T ako v tabuľke 1), ktoré obsahujú vodu, syntetickú odpadovú vodu a testovanú chemikáliu, by sa mali pripraviť tak, aby sa dosiahli rôzne nominálne hodnoty koncentrácie testovanej chemikálie (príklad objemov zložiek je uvedený v tabuľke 1). Hodnota pH by sa mala v prípade potreby upraviť na 7,5 ± 0,5. Zmesi by sa mali zriediť vodou a malo by sa pridať inokulum tak, aby sa dosiahol rovnaký konečný objem v nádobách a aby sa začalo prevzdušňovanie.

Referenčné zmesi

33. Zmesi (F_R) by sa mali pripravovať rovnakým spôsobom ako testovacie zmesi, a to s referenčnou chemikáliou, napríklad 3,5-dichlórfenolom, namiesto testovanej chemikálie.

▼M6

Slepé kontrolné vzorky

34. Slepé kontrolné vzorky (F_B) by sa mali pripravovať na začiatku a na konci expozície v rámci testov, pri ktorých sa testovacie kadičky pripravujú postupne v určitých intervaloch. V testoch vykonaných s použitím vybavenia, ktoré umožňuje súbežné merania spotreby kyslíka, by sa mali do každej série paralelných analýz začleniť najmenej dve slepé kontrolné vzorky. Slepé kontrolné vzorky obsahujú rovnaké množstvo aktivovaného kalu a syntetického média, ale neobsahujú testovanú ani referenčnú chemikáliu. Zriediť by sa mali vodou na rovnaký objem, ako majú testovacie a referenčné zmesi.

Abiotické kontrolné vzorky

35. V prípade potreby, napríklad ak je známe alebo sa predpokladá, že testovaná chemikália má silne redukčné vlastnosti, by sa na meranie abiotickej spotreby kyslíka mala pripraviť zmes F_A. Zmes by mala obsahovať rovnaké množstvo testovanej chemikálie, syntetickej odpadovej vody a mala by mať rovnaký objem ako testovacie zmesi, no nemala by obsahovať aktivovaný kal.

Všeobecný postup a merania

36. Testovacie zmesi, referenčné zmesi a slepé a abiotické kontrolné vzorky sa inkubujú pri skúšobnej teplote v podmienkach núteného prevzdušňovania (0,5 – 1 l/min), aby sa koncentrácia rozpusteného kyslíka udržiavala nad úrovňou 60 – 70 % saturácie a aby sa v suspenzii udržali vločky kalu. Na to, aby sa v suspenzii vločky kalu udržali, je potrebné aj miešanie kultúr. Za začiatok inkubácie sa považuje počiatočný kontakt inokula aktivovaného kalu s ostatnými zložkami konečnej zmesi. Na konci inkubácie, po stanovenom čase expozície zvyčajne v dĺžke troch hodín, sa odoberú vzorky na meranie miery zníženia koncentrácie rozpusteného kyslíka v komore navrhnutej na tento účel (obrázok 2 v dodatku 3) alebo v úplne plnej fľaši BOD. Spôsob, akým sa inkubácia začne, závisí aj od vlastností zariadenia použitého na meranie rýchlostí spotreby kyslíka. Napríklad, ak je jeho súčasťou jedna kyslíková sonda, merania sa vykonávajú samostatne. V tom prípade by sa mali pripraviť rôzne zmesi potrebné na test v syntetickej odpadovej vode, no vynechať by sa malo inokulum, a do každej nádoby zo série by sa mali pridať príslušné časti kalu. Následne by sa každá inkubácia mala začať vo vhodne načasovaných intervaloch napr. 10 – 15 minút. Alternatívne môžu byť súčasťou meracieho systému viaceré sondy, ktoré uľahčia súbežné vykonávanie viacerých meraní. V tom prípade sa môže inokulum pridať súčasne do príslušných skupín nádob.

37. Nominálna hodnota koncentrácie aktivovaného kalu vo všetkých testovacích, referenčných a slepých (ale nie abiotických kontrolných) zmesiach je 1,5 g/l suspendovaných tuhých látok. Spotreba kyslíka by sa mala merať po troch hodinách expozície. Podľa potreby by sa mali po 30-minútovej expozícii vykonať doplnkové merania opísané v bode 5.

Nitrifikačný potenciál kalu

38. Na to, aby bolo možné rozhodnúť, či kal nitrifikuje, a ak áno, do akej miery, by sa mali pripraviť zmesi (F_B) ako slepé kontrolné zmesi a doplnkové „kontrolné“ zmesi (F_N), ktoré však obsahujú aj *N*-alyltiomočovinu s koncentráciou

▼M6

11,6 mg/l. Zmesi by sa mali prevzdušňovať a inkubovať pri teplote 20° ± 2 °C počas troch hodín. Potom by sa mali zmerať rýchlosti spotreby kyslíka a vypočítať rýchlosť spotreby kyslíka spôsobená nitrifikáciou.

Koncepcie testov

Test na vyhľadávanie rozsahu

39. Predbežná skúška sa v prípade potreby používa na odhadnutie rozsahu koncentrácií testovanej chemikálie potrebných pri konečnom teste na stanovenie inhibície spotreby kyslíka. Ak počas predbežnej skúšky nedochádza k inhibícii spotreby kyslíka testovanou chemikáliou, môže to znamenať, že konečný test nie je potrebný. Mali by sa však vykonať tri opakované merania s najvyššou testovacou koncentráciou v rámci predbežnej skúšky (spravidla 1 000 mg/l, ale závisí to od požadovaných údajov).

Tabuľka 1

Príklady zmesí pre predbežnú skúšku

Reagenty	Pôvodná koncentrácia				
Zásobný roztok testovanej chemikálie	10 g/l				
Zásobný roztok syntetického média	pozri bod 16				
Zásobná suspenzia aktivovaného kalu	3 g/l suspendovaných tuhých látok				
Zložky zmesí	Dávkovanie do testovacích nádob ([a])				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3-5}	F_{B1-2}	F_A
Zásobný roztok testovanej chemikálie (ml) (body 19 až 21)	0,5	5	50	0	50
Zásobný roztok zdroja syntetickej odpadovej vody (ml) (bod 16)	16	16	16	16	16
Suspenzia aktivovaného kalu (ml) (body 26 až 29)	250	250	250	250	0
Voda (bod 15)	233,5	229	184	234	434
Celkový objem zmesí (ml)	500	500	500	500	500
Koncentrácie v zmesi					
Testovacia suspenzia (mg/l) Aktivovaný kal	10	10	1 000	0	1 000
(suspendované tuhé látky) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

([a]) Ten istý postup by sa mal dodržať pri príprave referenčnej chemikálie v bankách $F_{R1–3}$.

40. Test by sa mal vykonať použitím najmenej troch koncentrácií testovanej chemikálie, napríklad 10 mg/l, 100 mg/l a 1 000 mg/l, so slepou kontrolnou vzorkou a v prípade potreby s najmenej tromi abiotickými kontrolnými vzorkami s najvyššími koncentráciami testovanej chemikálie (pozri príklad v tabuľke 1). V ideálnom prípade by najnižšia koncentrácia nemala mať

▼M6

žiadny účinok na spotrebu kyslíka. V prípade potreby by sa mali vypočítať rýchlosti spotreby kyslíka a rýchlosť nitrifikácie a následne percentuálna hodnota inhibície. V závislosti od účelu testu je tiež možné jednoducho stanoviť toxicitu hraničnej hodnoty koncentrácie, napríklad 1 000 mg/l. Ak sa pri tejto koncentrácii nezistí žiadny štatisticky významný toxický účinok, ďalšie testovanie pri vyšších alebo nižších koncentráciách nie je potrebné. Treba si uvedomiť, že látky slabo rozpustné vo vode, zmesi so zložkami s rôznou rozpustnosťou vo vode a adsorpčné látky by sa mali odvážiť priamo do testovacích nádob. V tomto prípade by sa objem vyhradený pre zásobný roztok testovanej látky mal nahradiť vodou na zriedenie.

Konečný test

Inhibícia celkovej spotreby kyslíka

41. Test by sa mal vykonať s použitím rôznych koncentrácií stanovených na základe predbežnej skúšky. Na získanie hodnôt koncentrácií NOEC a EC_x (napr. EC_{50}) sa vo väčšine prípadov odporúča použiť šesť koncentrácií kontrolných vzoriek a päť koncentrácií vzoriek s aplikovanou chemikáliou, v geometrickom rade s piatimi replikátmi. Merania abiotických kontrolných vzoriek nie je potrebné opakovať, ak počas predbežnej skúšky nedošlo k spotrebe kyslíka. Ak sa však zistí výrazná spotreba kyslíka, abiotické kontrolné vzorky by sa mali použiť pre každú koncentráciu testovanej chemikálie. Citlivosť kalu by sa mala skontrolovať pomocou referenčnej chemikálie 3,5-dichlórfenol. Kontrola citlivosti kalu by sa mala vykonať pre každú testovaciu sériu, keďže je známe, že hodnota citlivosti kolíše. Vo všetkých prípadoch sa vzorky odoberú z testovacích nádob po 3 hodinách a v prípade potreby po ďalších 30 minútach na meranie rýchlosti spotreby kyslíka v komore s kyslíkovou elektródou. Zo získaných údajov sa vypočítajú špecifické hodnoty rýchlosti spotreby kyslíka v prípade kontrolných a testovacích zmesí. Následne sa z rovnice 7 vypočíta percentuálna inhibícia.

Rozlišovanie medzi inhibíciou heterotrofnej respirácie a nitrifikácie

42. Použitie špecifického inhibítora nitrifikácie – ATM – umožňuje priame posúdenie inhibičných účinkov testovanej chemikálie na heterotrofnú oxidáciu. Účinky na mieru nitrifikácie je možné vypočítať ako rozdiel celkovej spotreby kyslíka (bez prítomnosti ATM) a spotreby kyslíka v prítomnosti ATU. Pripraviť by sa mali dva súbory reakčných zmesí podľa koncepcie testu pre koncentrácie EC_x alebo NOEC opísané v bode 41. Okrem toho by sa však mal inhibítor ATM pridať do každej zmesi jedného súboru s konečnou koncentráciou 11,6 mg/l, pri ktorej sa preukázala úplná inhibícia nitrifikácie v kale so suspendovanými tuhými látkami pri koncentráciách do 3 000 mg/l (4). Spotreba kyslíka by sa mala merať po uplynutí času expozície. Tieto priamo získané hodnoty predstavujú iba heterotrofnú respiráciu a rozdiely medzi nimi a zodpovedajúcimi hodnotami celkovej rýchlosti spotreby kyslíka zasa nitrifikáciu. Následne sa vypočítajú rôzne stupne inhibície.

Merania

43. Po uplynutí expozičného času, resp. časov by sa vzorka z prvej prevzdušňovacej nádoby mala presunúť do komory s kyslíkovou elektródou (obrázok 1 v dodatku 2) a okamžite by sa mala zmerať koncentrácia rozpusteného kyslíka. Ak je k dispozícii systém s viacerými elektródami, merania sa môžu vykonať súbežne. Dôležité je miešanie (pomocou zabudovaného magnetu) rovnakou rýchlosťou ako pri kalibrovaní elektródy, aby sa zabezpečilo, že sonda reaguje na meniace sa koncentrácie kyslíka s minimálnym oneskorením a že sa umožní pravidelné a reprodukovateľné meranie kyslíka

▼M6

v meracej nádobe. Zvyčajne je vhodný systém niektorých kyslíkových elektród so sondou s automatickým miešaním. Komoru je potrebné medzi meraniami vypláchnuť vodou. Vzorka sa môže prípadne použiť na vyplnenie BOD fľaše (obrázok 2 v dodatku 3) vybavenej magnetickým miešadlom. Do hrdla fľaše by sa následne mala vložiť kyslíková sonda s manžetovým adaptérom a zapnúť magnetické miešadlo. V obidvoch prípadoch by sa mala priebežne merať a zaznamenávať koncentrácia rozpusteného kyslíka, zvyčajne 5 – 10 minút, alebo kým koncentrácia kyslíka neklesne pod 2 mg/l. Elektróda by sa potom mala odobrať, zmes vrátiť späť do prevzdušňovacej nádoby, a ak je potrebné meranie po dlhšej expozícii, malo by pokračovať prevzdušňovanie a miešanie.

Overovanie koncentrácie testovanej chemikálie

44. Na určité účely môže byť potrebné meranie koncentrácie testovanej chemikálie v testovacích nádobách. Treba si uvedomiť, že ak sa používajú zásobné roztoky:

— látok slabo rozpustných vo vode,

— zmesí so zložkami s rôznou rozpustnosťou vo vode alebo

— látok s dobrou rozpustnosťou vo vode, pričom koncentrácia zásobného roztoku sa približuje maximálnej rozpustnosti vo vode,

rozpustená frakcia nie je známa rovnako, ako nie je známa skutočná koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá sa presúva do testovacích nádob. Na to, aby bolo možné charakterizovať expozíciu, je potrebné analytické stanovenie koncentrácie testovanej chemikálie v testovacích nádobách. Na zjednodušenie postupu by sa malo analytické stanovenie vykonať pred pridaním inokula. Vzhľadom na skutočnosť, že do testovacích nádob sa presunú len rozpustené frakcie, môžu byť namerané hodnoty koncentrácie veľmi nízke.

45. S cieľom vyhnúť sa časovo náročným a nákladným analýzam sa odporúča jednoducho odvážiť testovanú chemikáliu priamo do testovacích nádob a na ďalšie výpočty použiť nominálne hodnoty koncentrácie zistené počiatočným vážením. Rozlišovanie medzi rozpustenými, nerozpustenými alebo adsorbovanými frakciami testovanej chemikálie nie je potrebné, lebo v reálnych podmienkach sa všetky tieto frakcie vyskytujú v čistiarni odpadových vôd rovnako, pričom sa môžu líšiť v závislosti od zloženia odpadových vôd. Cieľom tejto testovacej metódy je reálny odhad neinhibičnej koncentrácie, pričom metóda nie je vhodná na podrobné skúmanie, ktoré frakcie prispievajú k inhibícii organizmov aktivovaného kalu. Napokon, aj adsorbčné látky by sa mali odvážiť priamo do testovacích nádob a nádoby by mali byť silanizované, aby sa minimalizovali straty vzniknuté adsorbciou.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Výpočet rýchlostí spotreby kyslíka

46. Rýchlosti spotreby kyslíka by sa mali vypočítať z priemeru nameraných hodnôt, napríklad z lineárnej časti grafov závislosti koncentrácie kyslíka od času, pričom výpočet by sa mal obmedziť na koncentrácie kyslíka medzi 2,0 mg/l a 7,0 mg/l, keďže vyššie a nižšie koncentrácie môžu samy osebe ovplyvniť hodnoty miery spotreby. Niekedy je nevyhnutné

▼**M6**

a potrebné preskúmať aj pásma koncentrácií nižších alebo vyšších než sú uvedené hodnoty, napríklad ak je respirácia výrazne znížená, a preto veľmi pomalá, alebo ak daný aktivovaný kal respiruje veľmi rýchlo. To je prípustné za predpokladu, že rozšírené úseky krivky grafu spotreby sú rovné a ich sklon sa nemení pri prechode hranicami 2,0 mg/l alebo 7,0 mg/l O_2. Akýkoľvek zakrivený úsek grafu naznačuje, že merací systém sa stabilizuje alebo že sa spotreba mení, a nemali by sa používať na výpočet rýchlosti spotreby kyslíka. Rýchlosť spotreby kyslíka by sa mala vyjadriť v miligramoch na liter za hodinu (mg/lh) alebo v miligramoch na gram suchého kalu za hodinu (mg/gh). Rýchlosť spotreby kyslíka (R) v mg/lh sa môže vypočítať alebo interpolovať z lineárnej časti grafu zaznamenávajúceho pokles množstva kyslíka, podľa rovnice 1:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \qquad (1)$$

kde:

Q_1 je koncentrácia kyslíka na začiatku vybratého úseku lineárnej fázy (mg/l),

Q_2 je koncentrácia kyslíka na konci vybratého úseku lineárnej fázy (mg/l),

Δ_t je časový interval medzi týmito dvomi meraniami (min).

47. Špecifická rýchlosť spotreby kyslíka (R_S) sa vyjadrí ako množstvo spotrebovaného kyslíka na gram suchej hmotnosti kalu za hodinu (mg/gh) podľa rovnice 2:

$$R_s = R/SS \qquad (2)$$

kde SS je koncentrácia suspendovaných tuhých látok v testovacej zmesi (g/l).

48. Kombinovať sa môžu rôzne indexy R:

S špecifická rýchlosť spotreby kyslíka,

T celková rýchlosť spotreby kyslíka,

N rýchlosť ovplyvnená nitrifikačnou respiráciou,

H rýchlosť ovplyvnená heterotrofnou respiráciou,

A rýchlosť ovplyvnená abiotickými procesmi,

B rýchlosť na základe slepých vzoriek (stredná hodnota).

Výpočet rýchlosti spotreby kyslíka ovplyvnenej nitrifikáciou

49. Vzťah medzi celkovou rýchlosťou (R_T), nitrifikačnou respiráciou (RN) a heterotrofnou respiráciou (RH) je daný rovnicou 3:

$$R_N = R_T - R_H \qquad (3)$$

kde:

R_N je rýchlosť spotreby kyslíka ovplyvnená nitrifikáciou (mg/lh),

R_T je rýchlosť spotreby kyslíka nameraná pomocou slepej kontrolnej vzorky bez ATM, F_B) (mg/lh),

R_H je rýchlosť spotreby kyslíka nameraná pomocou slepej kontrolnej vzorky s pridaním ATM (F_N) (mg/lh).

▼M6

50. Tento vzťah platí pre hodnoty získané pomocou slepých vzoriek (R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}), abiotických kontrolných vzoriek (R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}) a vzoriek s testovanými chemikáliami (R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}) (mg/gh). Konkrétne rýchlosti spotreby kyslíka sa vypočítajú z týchto vzťahov:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6)$$

51. Ak je v rámci predbežnej skúšky hodnota R_N zanedbateľná (napr. < 5 % hodnoty R_T v slepých kontrolných vzorkách), je možné predpokladať, že heterotrofná spotreba kyslíka sa rovná celkovej spotrebe a že nedochádza k žiadnej nitrifikácii. Ak by sa na základe testov mali posudzovať vplyvy na heterotrofné a nitrifikačné mikroorganizmy, bol by potrebný alternatívny zdroj aktivovaného kalu. Konečný test sa vykoná, ak existuje dôkaz o zníženej spotrebe kyslíka pri rôznych koncentráciách testovanej chemikálie.

Výpočet percenta inhibície

52. Percentuálna inhibícia celkovej spotreby kyslíka (I_T) pri každej koncentrácii testovanej chemikálie sa vypočíta podľa rovnice 7:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100\ \% \quad (7)$$

53. Podobne sa vypočíta percentuálna inhibícia heterotrofnej spotreby kyslíka (I_H) pri každej koncentrácii testovanej chemikálie podľa rovnice 8:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \ / \ 100\ \% \quad (8)$$

54. A napokon inhibícia spotreby kyslíka ovplyvnenej nitrifikáciou (I_N) sa pri každej koncentrácii vypočíta podľa rovnice 9:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100\ \% \quad (9)$$

55. Mal by sa zostrojiť diagram závislosti percentuálnej inhibície spotreby kyslíka od logaritmu koncentrácie testovanej chemikálie (inhibičná krivka, pozri obrázok 3 v dodatku 4). Inhibičné krivky sa zostroja pre každé prevzdušňovanie v trvaní 3 hodín alebo po ďalších 30 minútach. Koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá vyvolá inhibíciu spotreby kyslíka o 50 % (EC_{50}), by sa mala vypočítať alebo interpolovať z grafu. Ak sú k dispozícii vhodné údaje, môžu sa vypočítať alebo interpolovať 95 % hranice spoľahlivosti pre koncentráciu EC_{50}, sklon krivky a vhodné hodnoty na označenie začiatku inhibície (napr. EC_{10} alebo EC_{20}) a konca rozsahu inhibície (napr. EC_{80} alebo EC_{90}).

56. Je potrebné si uvedomiť, že vzhľadom na premenlivosť často pozorovanú vo výsledkoch môže v mnohých prípadoch postačovať vyjadrenie výsledkov v rozsahu hodnôt, napríklad:

EC_{50} < 1 mg/l

EC_{50} 1 mg/l až 10 mg/l

EC_{50} 10 mg/l až 100 mg/l

EC_{50} > 100mg/l

Interpretácia výsledkov

EC_x

▼M6

57. Hodnoty EC_x vrátane ich príslušných horných a dolných 95 % hraníc spoľahlivosti pre daný parameter sa vypočítajú pomocou vhodných štatistických metód [napr. probitová analýza, logistická alebo Weibullova funkcia, upravená Spearman-Karberova metóda alebo jednoduchá interpolácia (11)]. Koncentrácia EC_x sa získa zadaním hodnoty, ktorá zodpovedá x % strednej hodnoty nameranej v kontrolnej vzorke, do príslušnej rovnice. Pri výpočte EC_{50} alebo akejkoľvek inej hodnoty EC_x by sa mali stredné hodnoty pre každú vzorku s aplikovanou chemikáliou (x) podrobiť regresnej analýze.

Odhad koncentrácie NOEC

58. Ak je cieľom štatistickej analýzy stanovenie koncentrácie NOEC, potrebné sú štatistické údaje pre každú nádobu (jednotlivé nádoby sa považujú za replikáty). Používať by sa mali vhodné štatistické metódy (podľa dokumentu OECD o súčasných prístupoch v štatistickej analýze údajov o ekotoxicite: návod na uplatňovanie (11). Vo všeobecnosti sa nepriaznivé účinky testovanej chemikálie v porovnaní s kontrolnými vzorkami skúmajú pomocou jednostranného (obmedzeného) testovania hypotéz pri hodnote $p \leq 0,05$.

Protokol o skúške

59. Protokol o skúške by mal obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália

— bežný názov, chemický názov, číslo CAS, čistota,

— fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie [napr. log K_{ow}, rozpustnosť vo vode, tlak pár, Henryho konštanta (H) a prípadné informácie o osude testovanej chemikálie, napríklad o adsorpcii na aktivovanom kale].

Testovací systém

— zdroj, podmienky prevádzky čistiarne odpadových vôd a jej prítoku, koncentrácia, predúprava a údržba aktivovaného kalu.

Podmienky testu

— testovacia teplota, pH počas testu a trvanie expozičnej fázy, resp. fáz.

Výsledky

— konkrétna spotreba kyslíka v kontrolných vzorkách (mg O_2/g kalu × h),

— všetky namerané údaje, inhibičná krivka, resp. krivky a metóda výpočtu EC_{50},

— hodnota EC_{50}, a ak je to možné, 95 % hranice spoľahlivosti, prípadne hodnoty EC_{20}, EC_{80}; ak nie je možné stanoviť hodnotu EC_{50}, tak aj hodnotu NOEC a použité štatistické metódy,

— výsledky celkovej inhibície, a ak je to vhodné, heterotrofnej a nitrifikačnej inhibície,

— abiotická spotreba kyslíka vo fyzikálno-chemickej kontrolnej vzorke (ak sa používa),

— názov referenčnej chemikálie a výsledky dosiahnuté s touto chemikáliou,

— všetky pozorovania a odchýlky od štandardného postupu, ktoré by mohli ovplyvniť výsledky.

LITERATÚRA

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**

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov

Na účely tejto testovacej metódy sa používajú tieto pojmy.

Chemikália je látka alebo zmes.

EC_x (účinná koncentrácia x %) je koncentrácia, ktorá v rámci stanoveného času expozície vyvolá účinok x % na testované organizmy v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Napríklad EC_{50} je koncentrácia, pri ktorej sa odhaduje, že v stanovenom čase expozície vyvolá účinok na výsledok testu pri 50 % exponovanej populácie.

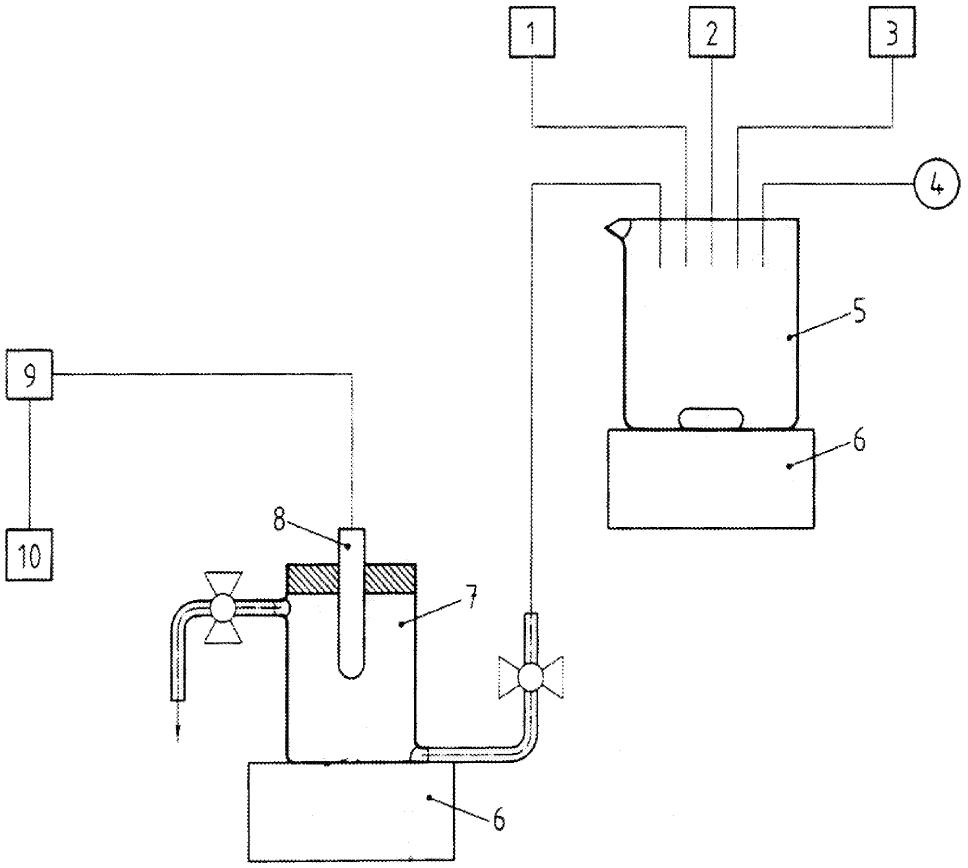
NOEC (koncentrácia bez pozorovaného účinku) je koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej sa nepozoruje žiadny účinok. V tomto teste koncentrácia zodpovedajúca hodnote NOEC nemá žiadny štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) v rámci daného času expozície v porovnaní s kontrolnou vzorkou.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

▼**M6**

Dodatok 2

Obrázok 1: **Príklad meracej jednotky**



Legenda

1 aktivovaný kal

2 syntetické médium

3 testovaná chemikália

4 vzduch

5 zmiešavacia nádoba

6 magnetické miešadlo

7 komora na meranie koncentrácie kyslíka

8 kyslíková elektróda

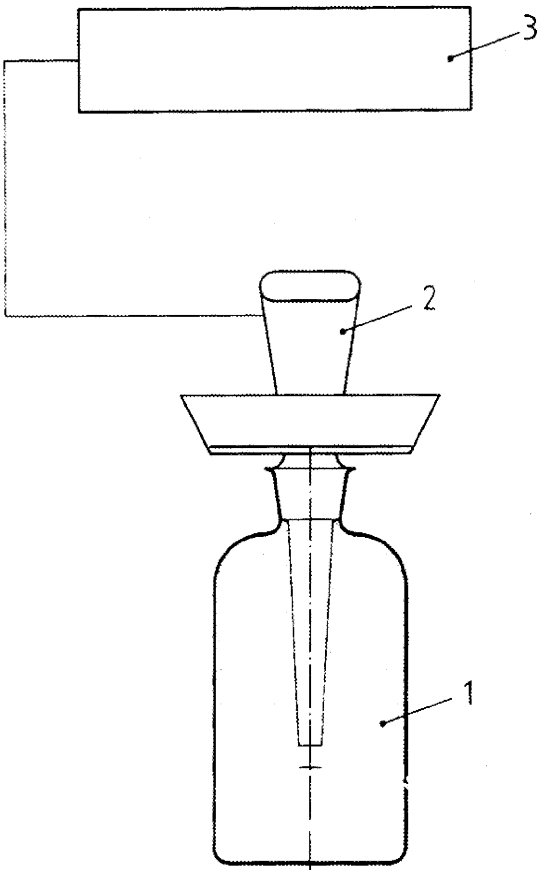
9 prístroj na meranie koncentrácie kyslíka

10 registračný prístroj

▼**M6**

Dodatok 3

Obrázok 2: **Príklad meracej jednotky s použitím BOD fľaše**



Legenda

1 testovacia nádoba

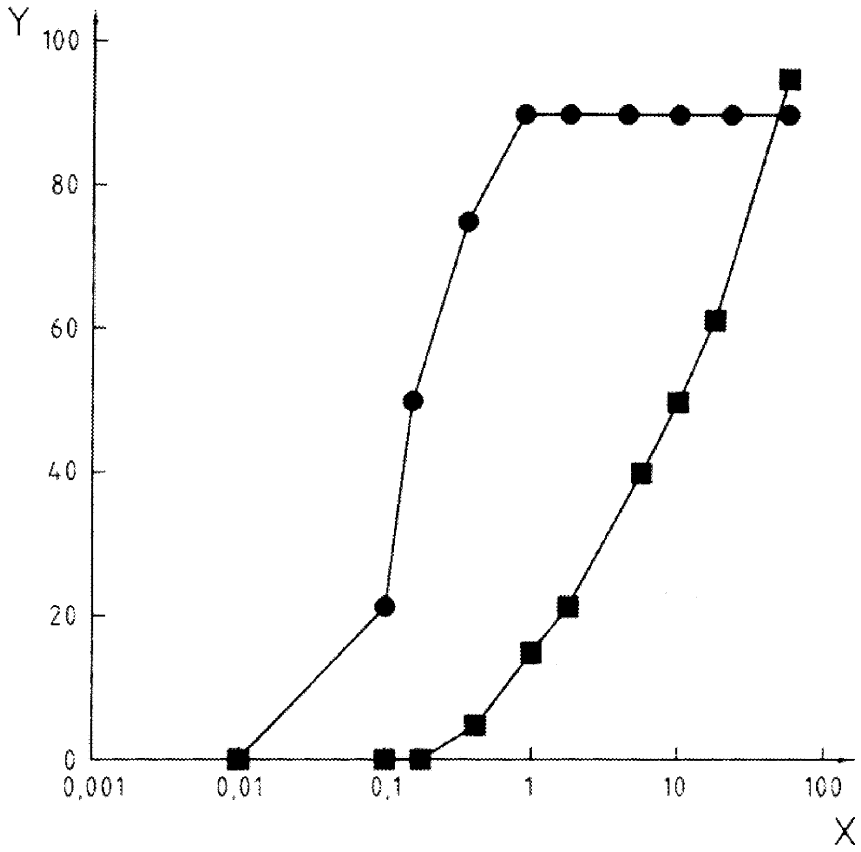
2 kyslíková elektróda

3 prístroj na meranie koncentrácie kyslíka

▼**M6**

Dodatok 4

Obrázok 3: **Príklad inhibičných kriviek**



Legenda

X koncentrácia 3,5-dichlórfenolu (mg/l)

Y inhibícia (%)

■ inhibícia heterotrofnej respirácie pomocou nitrifikačného kalu

● inhibícia nitrifikácie pomocou nitrifikačného kalu.

▼B

C.12. **BIODEGRADÁCIA**

MODIFIKOVANÝ SCAS-TEST

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Cieľom metódy je zhodnotiť potencionálnu konečnú biodegradovateľnosť vo vode rozpustných, stabilných organických látok, ak sú vystavené účinku relatívne vysokej koncentrácie mikroorganizmov počas dlhšieho časového obdobia. Životaschopnosť mikroorganizmov je udržiavaná počas tejto doby denným pridávaním živín sedimentovaných v odpadových vodách. (Počas víkendu môžu byť odpadové vody skladované pri 4 °C, alebo sa ako alternatíva môže použiť umelé syntetické médium podľa testov schválených OECD.)

Pri interpretácii výsledkov sa musí zobrať do úvahy možnosť fyzikálno-chemickej adsorpcie pri pevných látkach v testovacom systéme (pozri 3.2.).

V dôsledku dlhej detekčnej doby kvapalnej fázy (36 hodín) a prerušovaného pridávania živín, test nesimuluje také experimentálne podmienky, aké sa docielia pri čističke odpadových vôd. Výsledky získané pri rôznych testovaných látkach indikujú vysoký biodegradačný potenciál testu.

Podmienky navodené testom sú vysoko priaznivé k selekcii a/alebo adaptácii mikroorganizmov, ktoré majú schopnosť degradovať testované látky. (Procedúra môže byť využitá aj pre prípravu aklimatizovaného inokula, ktoré je prispôsobené použitiu v ďalších testoch.)

V tejto metóde sa na stanovenie podľahnutia testovanej látky biodegradácii používa nameraná koncentrácia rozpusteného organického uhlíka (DOC). Uprednostňuje sa stanovenie rozpusteného organického uhlíka (DOC) po acidifikácii a prečistení ako rozdiel $C_{celkové} - C_{anorganické}$.

Simultánne využitie špecifických analytických metód umožňuje stanoviť primárnu degradáciu látky (nedá sa už detekovať parentálna chemická štruktúra).

Metóda je aplikovateľná len na tie organické látky, ktoré pri danej koncentrácii použitej v teste:

— sú rozpustné vo vode (aspoň 20 mg rozpusteného organického uhlíka/liter),

— majú zanedbateľný tlak nasýtených pár,

— nepôsobia inhibične na baktérie,

— nedochádza u nich k signifikantnej adsorpcii v testovacom systéme,

— nemôže pri nich dôjsť k úbytku v testovacom roztoku penením.

V materiáli použitom v teste sa musí stanoviť obsah organického uhlíka.

▼B

Pri interpretácii získaných výsledkov sú vhodné informácie o relatívnom zložení hlavných komponentov v testovacom materiáli, najmä v prípadoch nízkych alebo marginálnych hodnôt výsledkov.

Pri interpretácii nízkych hodnôt výsledkov a pri selekcii vhodných testovacích koncentrácii sú užitočné informácie o možnej toxicite testovanej látky voči mikroorganizmom.

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

C_T = koncentrácia testovanej látky vo forme organického uhlíka, ktorý je prítomný alebo pridaný do média na začiatku prevzdušňovania (mg/liter),

C_t = koncentrácia rozpusteného organického uhlíka (DOC), zistená v teste pri ukončení prevzdušňovania (mg/liter),

C_c = koncentrácia rozpusteného organického uhlíka (DOC), zistená v kontrole testu po ukončení prevzdušňovania (mg/liter).

V tejto metóde je biodegradácia definovaná ako vymiznutie organického uhlíka. Biodegradácia môže byť vyjadrená ako:

1. Percento úbytku D_{da} z množstva látky pridanej denne:

$$D_{da} = \frac{C_t - (C_t - C_c)}{C_t} \times 100 \qquad [1]$$

kde

D_{da} = degradácia/denný prídavok.

2. Percento úbytku D_{ssd} množstva látky prítomnej na začiatku každého dňa:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\ (a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\ (b)]$$

kde

D_{ssd} = degradácia/látka na začiatku dňa,

indexy i a (i + l) sa vzťahujú na deň merania.

Vzorec 2 a) sa odporúča, ak hodnota rozpusteného organického uhlíka (DOC) v efluente lavíruje zo dňa na deň, kým vzorec 2 b) sa používa v prípade relatívne konštantnej hodnoty rozpusteného organického uhlíka (DOC) v efluente počas dní merania.

▼B

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

V určitých prípadoch, ak to výskum novej látky vyžaduje, odporúča sa využiť referenčnú látku. Žiadna konkrétna referenčná látka sa pri tomto teste neuvádza.

Údaje o niektorých látkach, vyhodnotené prostredníctvom kruhového testu, sa uvádzajú hlavne v dodatku 1, kvôli prípadnej kalibrácii metódy alebo pre porovnanie výsledkov získaných v ďalšej použitej metóde.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Aktivovaný kal z čističky odpadových vôd je umiestnený do semikontinuálnej jednotky aktivovaného kalu – SCAS jednotky. Pridá sa testovaná látka a sediment z domácich splaškových vôd a zmes sa prevzdušňuje 23 hodín. Po zastavení prevzdušňovania sa kal nechá usadiť a supernatant nad usadeninou sa odstráni.

Zostávajúci usadený kal v prevzdušňovacej komore sa zmieša s alikvótnym množstvom testovanej látky a sedimentom splaškových vôd a celý cyklus sa zopakuje.

Biodegradácia sa stanovuje určením obsahu rozpusteného organického uhlíka (DOC) v supernatante. Táto hodnota sa porovná s hodnotou získanou v kontrolnej vzorke, ktorá je tvorená len usadenými odpadovými vodami.

Pri použití špecifických analytických metód, môžu byť odmerané zmeny, ktoré nastali v koncentrácii parentálnej molekuly v dôsledku biodegradácie (primárna biodegradovateľnosť).

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Reprodukovateľnosť tejto metódy založenej na úbytku rozpusteného organického uhlíka (DOC) zatiaľ nebola preukázaná. (Ak uvažujeme primárnu biodegradovateľnosť, veľmi presné údaje sa získajú pri látkach, ktoré sú degradované vo veľkom rozsahu.)

Citlivosť metódy je do veľkej miery ovplyvnená variabilitou slepého pokusu a v menšej miere presnosťou stanovenia rozpusteného organického uhlíka (DOC) a hladinou testovanej látky v počiatočnom objeme na začiatku každého cyklu.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. *Príprava*

Použije sa čistá prevzdušňovacia aparatúra vo vhodnej veľkosti alebo, ako alternatíva, zostavená pôvodná 1,5 l SCAS jednotka s prívodovou trubicou vzduchu (obr. 1) pre každú testovanú látku a kontroly. Stlačený vzduch dodávaný do testovacích jednotiek po prečistení cez vatový filter by mal byť bez prímesi organického uhlíka a vopred saturovaný vodou, aby sa zabránilo strate vyparovaním.

Vzorka zmesi, obsahujúca 1 až 4 g suspendovanej pevnej látky/liter, sa získa z aktivovaného kalu čističky odpadových vôd spracovávajúcej domáce splaškové vody. Na jednu prevzdušňovaciu jednotku sa vyžaduje približne 150 ml tejto zmesi.

▼B

Zásobné roztoky testovanej látky sa pripravujú v destilovanej vode, pričom normálne vyžadovaná koncentrácia je 400 mg/liter vo forme organického uhlíka, z čoho vyplýva, že koncentrácia testovanej zložky na začiatku každého cyklu prevzdušňovania je 20 mg/liter vo forme uhlíka, ak nedochádza k biodegradácii.

Ak to umožňuje toxicita látky voči mikroorganizmom, môže sa použiť aj vyššia koncentrácia.

Meria sa obsah organického uhlíka v zásobnom roztoku.

1.6.2. *Podmienky testu*

Teplota pri teste sa má pohybovať v rozmedzí 20 °C až 25 °C.

Používa sa vysoká koncentrácia aeróbnych mikroorganizmov (1 g/liter až 4 g/liter suspendovanej pevnej látky) a efektívna detenčná doba je 36 hodín. Uhlíkový materiál zo živín odpadových vôd podlieha rýchlo oxidácii, v normálnych podmienkach zoxiduje po ôsmych hodinách od začiatku každého cyklu prevzdušňovania. Potom do ukončenia cyklu prevzdušňovania kal respiruje endogénne a počas tejto doby je jediným dostupným zdrojom testovaná látka, ak aj táto nie je ľahko metabolizovateľná. Tieto charakteristiky v kombinácii s každodennou inokuláciou a za použitia domácich splaškových vôd ako média poskytujú vysokovhodné podmienky pre aklimatizáciu ako aj pre vysokú mieru biodegradácie.

1.6.3. *Vykonanie testu*

Odoberie sa vzorka zmesi z kalu aktivovaného domácimi splaškovými vodami z čističky alebo laboratórnej jednotky a udržiava sa v aeróbnom stave až do jej spracovania v laboratóriu. Každá prevzdušňovacia jednotka ako aj kontrolná jednotka sa naplní 150 ml roztoku zmesi (v prípade použitia originálneho testu SCAS sa vynásobí uvedený objem desiatimi) a následne sa začne prevzdušňovať. Po 23 hodinách sa prevzdušňovanie ukončí a kal sa nechá 45 minút sedimentovať. Po otočení kohútika na každej nádobe sa odoberie 100 ml supernatantu. Vzorka sedimentu z domácich splaškových vôd sa získava tesne pred použitím a pridá sa 100 ml kalu, ktorý zostal v jednotlivých prevzdušňovači ch jednotkách. Prevzdušňovanie sa následne obnoví. V tomto štádiu sa nepridáva žiadny testovaný materiál, ale do jednotky sa dodáva denne zmes domácich splaškových vôd, až pokým sa nevytvorí po sedimentácii čistý supernatant. Tento proces zvyčajne prebieha dva týždne, počas ktorých sa približuje obsah rozpusteného organického uhlíka (DOC) v supernatante konštantnej hodnote na konci každého cyklu prevzdušňovania.

Na konci tejto periódy sa jednotlivé usadené kaly zmiešajú a 50 ml výsledného zloženého kalu sa pridá do každej jednotky.

Do kontrolnej jednotky sa pridá 95 ml sedimentu z odpadových vôd a 5 ml vody, do testovacích jednotiek sa pridá 95 ml sedimentu z odpadových vôd a 5 ml z vhodného zásobného roztoku testovanej látky (400 mg/liter). Znovu sa začne s prevzdušňovaním počas nasledujúcich 23 hodín. Kal sa nechá sedimentovať 45 minút, supernatant sa odoberie a analyzuje sa obsah rozpusteného organického uhlíka (DOC).

Opísaný postup pridávania a odberov sa prevedie denne počas celého trvania testu.

▼B

Pred sedimentáciou je potrebné očistiť steny prevzdušňovacej jednotky, aby sa zabránilo akumulácii pevných častíc nad hladinou kvapaliny. V každej jednotke sa musí použiť iná škrabka alebo kefka, aby nedošlo ku prenosu kontaminácie medzi jednotkami.

V ideálnom prípade sa stanovuje obsah rozpusteného organického uhlíka (DOC) v supernatante denne, ale prípustné sú aj menej frekventované analýzy. Pred samotnou analýzou sa supernatant filtruje cez premyté 0,45 um membránové filtre alebo sa scentrifuguje. Membránové filtre sú prípustné, ak je potvrdené, že sa z nich neuvoľňuje uhlík, alebo že nevyvolávajú adsorpciu pevných častíc počas filtrácie. Teplota vzorky počas centrifugácie nesmie presiahnuť 40 °C.

Dĺžka trvania testu pri látkach, ktoré vykazujú len malú alebo žiadnu biodegradáciu, nie je určená, ale skúsenosti naznačujú, že by to malo byť vo všeobecnosti aspoň 12 týždňov, ale nie dlhšie ako 26 týždňov.

2. ÚDAJE A PLATNOSŤ

Zistené hodnoty rozpusteného organického uhlíka (DOC) v supernatante testovacích aj kontrolných jednotiek sa vynesú do grafov v závislosti od času.

Pri dosiahnutí biodegradácie sa výsledky zistené v teste začnú približovať kontrolným výsledkom. Ak je v troch nasledujúcich meraniach zistený konštantný rozdiel medzi testovacími a kontrolnými jednotkami, vykoná sa už len taký počet meraní, aby bolo možné údaje štatisticky spracovať a vypočítať percento biodegradácie testovanej látky alebo prípravku (D_{da} alebo D_{ssd}, pozri odsek 1.2).

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí, ak je to možné, obsahovať tieto informácie:

— všetky informácie o type odpadových vôd, type použitých jednotiek, o experimentálnych výsledkoch zahŕňajúcich testovanú látku, referenčnú látku, ak bola použitá a slepú vzorku,

— teplotu,

— úbytkovú krivku aj s opisom, spôsob výpočtu (pozri 1.2),

— dátum a lokalita, kde boli odobraté vzorky aktivovaného kalu a odpadovej vody, stav adaptácie, koncentrácie atď.,

— vedecké odôvodnenie akýchkoľvek zmien v testovacej metóde,

— podpis a dátum.

▼B

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Keďže látka testovaná danou metódou zvyčajne nie je ľahko biodegradovateľná, normálny úbytok organického uhlíka v dôsledku samotnej biodegradácie bude v priebehu dní až týždňov postupný, okrem tých prípadov, keď dôjde k náhlej aklimatizácii sprevádzanej rapídnym vymiznutím uhlíka po niekoľkých týždňoch.

Významnú úlohu zohráva však v niektorých prípadoch fyzikálnochemická adsorpcia, čo sa dá indikovať na základe úplného alebo čiastočného úbytku rozpusteného organického uhlíka (DOC) pridaného na začiatku procedúry. Nasledujúci proces závisí od faktorov, ako sú stupeň adsorpcie alebo koncentrácia suspendovaných pevných častíc v odstránenom efluente. Zvyčajne sa rozdiel medzi koncentráciou rozpusteného organického uhlíka v kontrolnom a testovanom supernatante postupne zvyšuje z pôvodnej nízkej hodnoty a tento rozdiel sa potom udržuje na určitej novej hodnote po zbytok experimentu, pokiaľ nedôjde k aklimatizácii.

Pre zistenie rozdielu medzi biodegradáciou (alebo čiastočnou biodegradáciou) a adsorpciou je potrebné použiť ďalšie testy. Existuje viacero možných spôsobov, ale najvýhodnejšie je využiť supernatant alebo kal ako inokulum v základnej sade testov, pričom sa preferuje respirometrický test.

Testovaná látka, ktorá v teste vykazuje vysoký úbytok rozpusteného organického uhlíka, a to nie v dôsledku adsorpcie, sa považuje za potencionálne biodegradovateľnú. Čiastočný úbytok (nie v dôsledku adsorpcie) indikuje, že testovaná látka podlieha aspoň určitej obmedzenej biodegradácii.

Nízky alebo žiadny úbytok rozpusteného organického uhlíka môže byť spôsobený inhibíciou mikroorganizmov testovanou látkou. Dôkazom je lýza alebo strata kalu za tvorby zakaleného supernatantu. V tom prípade sa test môže zopakovať s použitím nižšej koncentrácie testovanej látky.

Vyššiu citlivosť poskytujú niektoré špecifické analytické metódy alebo použitie testovanej látky so značeným ^{14}C uhlíkom. V prípade značeného ^{14}C uhlíka v testovanej látke, sa uskutočnená biodegradácia potvrdzuje zachytením $^{14}CO_2$.

V prípade interpretácie výsledkov v zmysle primárnej biodegradácie by sa v rámci možností malo uviesť aj vysvetlenie zmien chemickej štruktúry, ktoré zabránili detekovať pôvodnú testovanú látku.

Spolu s výsledkami získanými v slepej vzorke (banku) musí byť uvedená aj validácia analytických metód.

4. **LITERATÚRA**

(1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 A,* Decision of the Council C(81) 30 final.

▼B

Dodatok 1

Test SCAS: príklad výsledkov

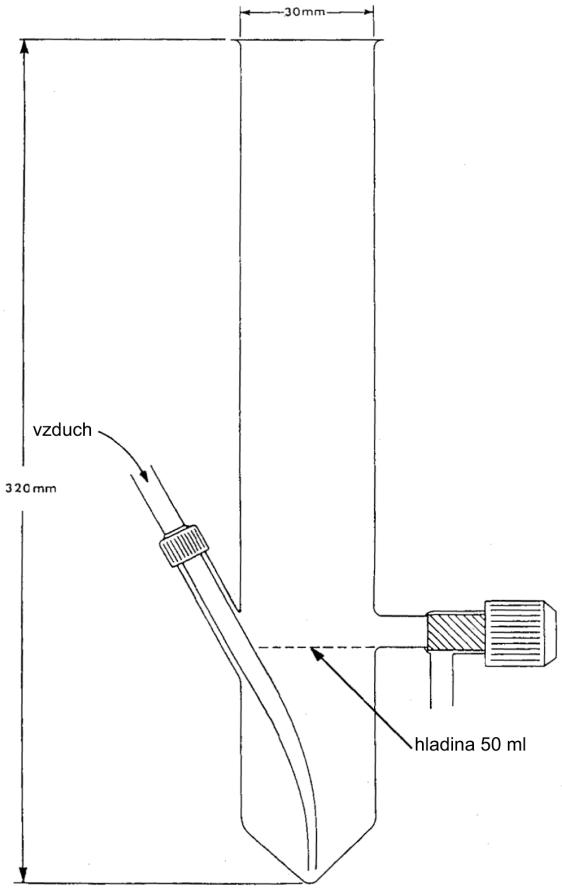
Látka	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	% biodegradácie (D_{ds})	Trvanie testu (dni)
4-acetyl aminobenzén sulfonát	17,2	2,0	85	40
tetrapropylénbenzén sulfonát	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
dietylénglykol	16,5	0,2	98,8	40
anilín	16,9	1,7	95,9	40
cyklopentan tetrakarboxylát	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Dodatok 2

Príklad testovacieho prístroja

Obrázok č. 1



▼M7

C.13. **BIOAKUMULÁCIA U RÝB: EXPOZÍCIA VO VODNOM PROSTREDÍ A Z POTRAVY**

ÚVOD

Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 305 (2012). Hlavný cieľ tejto revízie testovacej metódy je dvojaký. Po prvé, doplniť test bioakumulácie z potravy ([1]) vhodný na stanovenie bioakumulačného potenciálu látok s veľmi nízkou rozpustnosťou vo vode. Po druhé, vytvoriť takú testovaciu metódu, v rámci ktorej by sa v náležitých prípadoch používalo z dôvodu dobrých životných podmienok zvierat menej rýb a bola by nákladovo efektívnejšia.

Od schválenia konsolidovanej testovacej metódy C.13 (1) bolo testovaných množstvo látok a tak sa laboratóriám, ako aj regulačným orgánom podarilo získať dostatočné množstvo poznatkov. To viedlo k presvedčeniu, že zložitosť tohto testu je možné znížiť, ak sú splnené osobitné kritériá (pozri bod 88) a je možné použiť viacúrovňový prístup. Prax tiež ukázala, že výsledky môžu výrazne ovplyvniť biologické faktory ako rast a obsah lipidov v rybách, ktoré môže byť potrebné zohľadniť. Navyše sa zistilo, že testovanie látok s veľmi nízkou rozpustnosťou vo vode sa nemusí dať technicky realizovať. Okrem toho pre látky s veľmi nízkou rozpustnosťou vo vodnom prostredí môže mať expozícia vodou v porovnaní s expozíciou potravou len obmedzený význam. To viedlo k vypracovaniu testovacej metódy, v ktorej sú ryby vystavené účinkom z ich potravy (pozri body 7 – 14 a bod 97 a ďalej). Validácia (kruhovým testom) skúšky expozície z potravy bola vykonaná v roku 2010 (51).

Medzi hlavné zmeny patrí:

— testovanie iba jednej testovanej koncentrácie sa môže považovať za dostatočné, ak je pravdepodobné, že biokoncentračný faktor (BCF) nezávisí od testovanej koncentrácie,

— model testu s minimálnou vodnou expozíciou, pri ktorom je možný obmedzený počet odberu vzoriek skúšobných, ak sú splnené určité kritériá,

— obsah lipidov v rybách by sa mal merať tak, aby bolo možné vyjadriť hodnotu BCF na základe 5 % obsahu lipidov,

— väčší dôraz na odhad kinetického BCF (pokiaľ je možný) popri odhade BCF v ustálenom stave,

— pre určité skupiny látok sa navrhuje skúška expozície z potravy v prípade, že sa považuje za vhodnejší ako test vodnej expozície,

— hmotnosť rýb by sa mala merať tak, aby bolo možné opraviť hodnotu BCF_k s vzhľadom na rast.

Pred uskutočnením ktoréhokoľvek z testov bioakumulácie by mali byť známe tieto informácie o testovanej látke:

a) citlivosť analytickej metódy merania tkanív a koncentrácií testovanej látky a jej možných metabolitov vo vode a v potrave (pozri bod 65),

b) rozpustnosť vo vode [TM A.6], (2)]; v snahe získať spoľahlivé hodnoty by sa rozpustnosť mala stanovovať v súlade s tou metódou, ktorá zodpovedá (predpokladanej) škále rozpustnosti. Pri hydrofóbnych látkach je to zvyčajne metóda vypierania z kolóny;

([1]) Definície a jednotky sú uvedené v dodatku 1.

▼M7

c) rozdeľovací koeficient n-oktanol – voda, K_{OW} ([1]) [TM A.8 (4), A.24 (5), A.23 (6)], alebo iné vhodné informácie o správaní sa pri rozdeľovaní (napr. sorpcia na lipidy, K_{OC}); v snahe získať spoľahlivé hodnoty by sa rozpustnosť mala stanovovať v súlade s tou metódou, ktorá zodpovedá (predpokladanému) rozsahu K_{OW}. Pri hydrofóbnych látkach je to zvyčajne metóda pomalého miešania (6) [TM A.23 (6)];

d) stabilita látky vo vode (hydrolýza [TM C.7 (7)]);

e) stabilita látky v potrave (zvlášť v prípade, ak sa zvolí skúška expozície z potravy);

f) informácie o fototransformácii potrebné na nastavenie podmienok ožarovania v teste (8);

g) povrchové napätie (*t. j.* v prípade látok, pri ktorých nie je možné stanoviť log K_{OW}) [TM A.5 (9)];

h) tlak pár [TM A.4 (10)];

i) v prípade potreby akékoľvek informácie o biotickom alebo abiotickom odbúravaní vo vode napr. (nie však výlučne) ľahká biodegradovateľnosť [TM C.4 časti II až VII (11), C.29 (12)];

j) v prípade potreby informácie o metabolitoch: štruktúra, log K_{OW}, tvorba a odbúrateľnosť;

k) disociačná konštanta kyselín (pK_a) v prípade látok, ktoré by mohli ionizovať. V prípade potreby by sa malo upraviť pH skúšobnej vody tak, aby sa zabezpečilo, že látka bude počas testu v neionizujúcom stave, ak je tento stav zlučiteľný s daným druhom rýb.

V tejto testovacej metóde je opísaný postup charakterizácie bioakumulačného potenciálu látok v rybách, a to bez ohľadu na zvolenú metódu expozície alebo spôsob odberu vzoriek. Uprednostňujú sa hlavne modely prietokového testu, pričom prípustné sú aj polostatické modely za predpokladu, že boli splnené kritériá platnosti skúšky (pozri body 24 a 113). V prípade expozície z potravy nie je na udržanie koncentrácií testovanej látky vo vodnom prostredí potrebný prietokový model, ktorý však pomáha udržiavať adekvátne koncentrácie rozpusteného kyslíka, zabezpečovať čistú vodu a odstraňovať rôzne vplyvy, napr. produkty vylučovania.

Bez ohľadu na zvolenú testovaciu metódu je v tejto testovacej metóde uvedené dostatočné množstvo podrobností na uskutočnenie testu a súčasne poskytnutý adekvátny priestor na prispôsobenie pokusného modelu podmienkam jednotlivých laboratórií a na rôzne vlastnosti testovaných látok. Test vodnej expozície je najvhodnejšie použiť v prípade stálych organických látok s hodnotami log K_{OW} medzi 1,5 a 6,0 (13), no dá sa použiť aj v prípade vysokohydrofóbnych látok (s log $K_{OW} > 6,0$), ak sa preukáže stála a celkom rozpustená koncentrácia testovanej látky vo vode. Ak stálu koncentráciu testovanej látky vo vode nie je možné preukázať, štúdia vo vodnom prostredí nemusí byť vhodná, a preto sa môže vyžadovať testovanie látky v potrave rýb (hoci interpretácia a využitie výsledkov skúšky expozície z potravy môžu závisieť od regulačného rámca). Predbežné odhady biokoncentračného faktora (BCF, niekedy označovaný aj ako K_B) v prípade organických látok s hodnotami log K_{OW} približne do 9,0 možno získať použitím rovnice od Binteina *a kol.* (14). Predbežný odhad biokoncentračného faktora môže byť v prípade takýchto vysokohydrofóbnych látok

([1]) Niekedy sa označuje aj ako P_{OW}; stanovuje sa metódou trepačkovej banky opísanou v TM A.8 (3), metódou HPLC opísanou v TM.24 (4) a metódou pomalého miešania opísanou v TM A.23 (5). Na stanovenie log K_{OW} sa niekedy používa technika generátorových kolón. Existuje istý počet štúdií, v ktorých je táto technika použitá, najmä v prípade chlórovaných bifenylov a dibenzodioxínov (napr. Li and Doucette, 1993) (3). V prípade látok, ktoré môžu ionizovať, by mala log K_{OW} platiť pre neionizovanú formu.

▼M7

vyšší ako hodnota biokoncentračného faktora v ustálenom stave (BCF_{SS}), ktorá sa má dosiahnuť laboratórnymi pokusmi, zvlášť ak sa na stanovenie predbežného odhadu použije jednoduchý lineárny model. Medzi parametre charakterizujúce bioakumulačný potenciál patrí rýchlostná konštanta vychytávania (k_1), rýchlostné konštanty vylučovania vrátane rýchlostnej konštanty depurácie (k_2), biokoncentračný faktor v ustálenom stave (BCF_{SS}), kinetický biokoncentračný faktor (BCF_K) a potravový biomagnifikačný faktor (BMF) ([1]).

Testované látky označené rádioaktívnym izotopom môžu uľahčiť analýzu vzoriek vody, potravín a rýb a môžu sa použiť pri rozhodovaní o tom, či je potrebné vykonať identifikáciu a kvantifikáciu metabolitov. Ak sa meria iba celkové množstvo rádioaktívnych rezíduí (napríklad po spálení alebo solubilizácii tkaniva), hodnota BCF alebo BMF vychádza z celkového množstva materskej látky spolu so všetkými zadržanými metabolitmi a asimilovaným uhlíkom. Hodnoty BCF alebo BMF založené na celkovom množstve rádioaktívnych rezíduí preto nemožno priamo porovnávať s hodnotami BCF alebo BMF získanými špecifickou chemickou analýzou samotnej materskej látky. Separačné postupy ako TLC, HPLC alebo GC ([2]) možno použiť pred analýzou v rámci štúdií látok označených rádioaktívnym izotopom s cieľom určiť hodnoty BCF alebo BMF vychádzajúce z materskej látky. Ak sa použije niektorá zo separačných techník, mala by sa vykonať identifikácia a kvantifikácia materskej látky a príslušných metabolitov ([3]) (pozri bod 65), ak majú hodnoty BCF a BMF vychádzať z koncentrácie materskej látky v rybách, a nie z celkového množstva rezíduí označených rádioaktívnym izotopom. Možná je aj kombinácia štúdie metabolizmu ryb alebo štúdie distribúcie *in vivo* so štúdiou bioakumulácie na základe analýzy a identifikácie rezíduí v tkanivách. Pravdepodobnosť metabolizmu je možné predpovedať vhodnými nástrojmi (napr. súborom nástrojov OECD QSAR Toolbox (15) a patentovanými programami QSAR).

Rozhodnutie o tom, či vykonať skúšku expozície vo vodnom prostredí alebo expozície z potravy a za akých podmienok, by malo vychádzať z faktorov uvedených v bode 3 s prihliadnutím na príslušný regulačný rámec. Napríklad v prípade látok, ktoré majú vysokú hodnotu log K_{OW}, a napriek tomu naďalej vykazujú značnú rozpustnosť vo vode vzhľadom na citlivosť dostupných analytických techník, by sa malo v prvom rade zvážiť vykonanie testu vodnej expozície. Je však možné, že informácie o rozpustnosti vo vode nie sú v prípade týchto typov hydrofóbnych látok definitívne, preto by sa pred prijatím rozhodnutia o tom, ktorú testovaciu metódu použiť, mala preskúmať možnosť pripraviť stále a merateľné koncentrácie rozpustené vo vodnom prostredí (stabilné emulzie nie sú povolené) použiteľné pre štúdiu vodnej expozície (16). K tejto metóde nie je možné vypracovať presne predpísané pokyny k jej používaniu, ktoré by boli založené na rozpustnosti vo vode a hraničných kritériách rozdeľovacieho koeficientu oktanol – voda, keďže aj iné faktory (analytické techniky, degradácia, adsorpcia atď.) môžu mať z uvedených dôvodov značný vplyv na spôsob jej uplatňovania. Avšak hodnota log K_{OW} nad 5 a rozpustnosť vo vode pod ~0,01 – 0,1 mg/l označujú škálu látok, v prípade ktorých by testovanie použitím expozíciou vo vodnom prostredí mohlo byť čoraz ťažšie.

Do úvahy by sa mali vziať aj ďalšie faktory, ktoré môžu ovplyvniť výber testu vrátane adsorpčného potenciálu látky vo vzťahu k nosičom a prístrojovému vybaveniu a jej stability vo vodnom roztoku v porovnaní so stabilitou v potrave rýb (17) (18) atď.

Informácie o týchto praktických aspektoch môžu byť k dispozícii aj z iných ukončených štúdií vo vodnom prostredí. Ďalšie informácie o hodnotení aspektov týkajúcich sa výkonnosti bioakumulačných štúdií sú k dispozícii v odbornej literatúre (napr. 19).

V prípade látok, pri ktorých rozpustnosť alebo udržanie koncentrácií vo vodnom prostredí, ako aj ich analýza neobmedzujú realizáciu metódy vodnej expozície, sa táto metóda uprednostňuje na určenie biokoncentračného potenciálu látky. V každom prípade by sa malo overiť, či je použitá koncentrácia, resp. koncentrácie pri expozícii vo vodnom prostredí v rozsahu rozpustnosti testovaného

([1]) Definície a jednotky sú uvedené v dodatku 1.

([2]) TLC: chromatografia na tenkej vrstve, HPLC: vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, GC: plynová chromatografia.

([3]) V niektorých regulačných rámcoch môže byť povinné uskutočniť analýzu metabolitov za predpokladu splnenia určitých podmienok (pozri bod 65).

▼M7

média. Môžu sa použiť rôzne metódy udržiavania stabilných koncentrácií rozpustenej testovanej látky, napr. použitím zásobných roztokov alebo modelov pasívneho dávkovania (napr. metódou vypierania z kolóny), pokiaľ je možné preukázať udržanie stálych koncentrácií bez toho, aby došlo k zmene testovaného média odporúčaného v bode 27.

V prípade vysokohydrofóbnych látok (log K_{OW} > 5 a rozpustnosť pod ~ 0,01 – 0,1 mg/l) môže byť testovanie expozíciou vo vodnom prostredí čoraz ťažšie. Dôvody obmedzení môžu byť napr. neschopnosť udržať dostatočne stálu úroveň koncentrácie vo vodnom prostredí (napr. z dôvodu sorpcie na sklenené expozičné nádoby, príp. rýchleho vychytávania rybami) alebo nedostatočne vysoké úrovne použitých koncentrácií vo vodnom prostredí, ktoré sú v rovnakom rozpätí alebo nižšie ako analytický kvantifikačný limit ([1]). V prípade týchto vysokohydrofóbnych látok sa odporúča skúška expozície z potravy za predpokladu, že je v súlade s príslušným regulačným rámcom a potrebami hodnotenia rizík.

V prípade povrchovo aktívnych látok by sa na základe vlastností látky mala zvážiť realizovateľnosť testu biokoncentrácie vo vodnom prostredí, v opačnom prípade by asi bola vhodnejšia skúška expozície z potravy. Povrchovo aktívne látky sú činidlá, ktoré znižujú povrchové napätie medzi dvoma kvapalinami. Ich amfifilný charakter (t. j. obsah tak hydrofilnej, ako aj hydrofóbnej zložky) spôsobuje, že sa hromadia na rozhraniach, ako napr. voda – vzduch, voda – potrava, ako aj na sklenených stenách, čo znemožňuje presne stanoviť ich koncentráciu vo vodnom prostredí.

Skúškou expozície z potravy je možné sa vyhnúť niektorým aspektom expozície v prípade komplexných zmesí obsahujúcich zložky s rozdielnou maximálnou rozpustnosťou vo vode, keďže porovnateľná expozícia účinkom všetkých zložiek zmesi je pravdepodobnejšia ako metóda vo vodnom prostredí (pozri bod 20).

Treba však pripomenúť, že skúškou expozície z potravy sa získa skôr biomagnifikačný (BMF) ako biokoncentračný faktor (BCF) ([2]). Existujú postupy, ktorými je možné získať odhad kinetického biokoncentračného faktora (BCF_K) z údajov získaných zo skúšky expozície z potravy (pozri dodatok 8), mali by sa však používať opatrne. Vo všeobecnosti totiž tieto prístupy rátajú s kinetikou prvého rádu a dajú sa použiť iba v prípade určitých skupín zlúčenín. Nie je pravdepodobné, že by sa dali použiť v prípade povrchovo aktívnych látok (pozri bod 12).

Minimalistický model skúšky expozície vo vodnom prostredí s menším počtom odberu vzoriek, ktorým sa má znížiť množstvo zvierat a/alebo zdrojov (pozri bod 83 a ďalej), by sa mal použiť len v prípade takých látok, pri ktorých existuje dôvod sa domnievať, že vychytávanie i depurácia budú prebiehať podľa kinetiky prvého rádu (t. j. vo všeobecnosti ide o neionizované organické látky, pozri bod 88).

C.13 – I: **Test biokoncentrácie u rýb s expozíciou vo vodnom prostredí**

PRINCÍP TESTU

Test pozostáva z dvoch fáz: z expozičnej (vychytávacej) a post-expozičnej (depuračnej) fázy. Počas vychytávacej fázy sa skupina rýb jedného druhu rýb vystaví účinkom testovanej látky pri jednej alebo viacerých zvolených koncentráciách, a to v závislosti od vlastností testovanej látky (pozri bod 49). Potom sa premiestnia do média bez testovanej látky a začne sa depuračná fáza. Depuračná fáza je vždy povinná, pokiaľ vychytávanie testovanej látky počas vychytávacej

([1]) Vo všeobecnosti by koncentrácie vo vode merané vo fáze vychytávania mali byť aspoň o rádovú hodnotu vyššie ako kvantifikačný limit, aby bolo možné zmerať viac ako jeden polčas záťaže organizmu v depuračnej fáze štúdie.

([2]) Definície a jednotky sú uvedené v dodatku 1.

▼M7

fázy nie je významné. Počas oboch fáz testu sa sleduje koncentrácia testovanej látky v/na rybách (alebo v určitých rybích tkanivách). Okrem exponovanej skupiny existuje v rovnakých podmienkach, ale bez testovanej látky, aj kontrolná skupina rýb, ktorá slúži na porovnanie možných nepriaznivých účinkov pozorovaných v priebehu skúšky biokoncentrácie s vhodnou kontrolnou skupinou, ako aj na získanie pozaďových koncentrácií testovanej látky ([1]).

Pri skúške expozície vo vodnom prostredí trvá vychytávacia fáza obyčajne 28 dní. Jej trvanie sa môže v prípade potreby predĺžiť (pozri bod 18), alebo skrátiť, ak sa preukáže, že ustálený stav bol dosiahnutý skôr (pozri dodatok 1, definície a jednotky). Prognózu dĺžky vychytávacej fázy potrebnej na dosiahnutie ustáleného stavu možno vypočítať rovnicami, ktoré sú uvedené v dodatku 5. Depuračná fáza sa začne po tom, ako ryby prestanú byť vystavované účinkom testovanej látky a premiestnia sa do čistej nádoby s rovnakým médiom, ale bez testovanej látky. Všade, kde je to možné, sa vypočíta biokoncentračný faktor podľa možnosti ako pomer koncentrácie v rybách (C_f) a vo vode (C_w) pri ustálenom stave (BCF_{SS}, pozri definíciu v dodatku 1) a ako kinetický biokoncentračný faktor (BCF_K, pozri dodatok 1, definície a jednotky), ktorý sa odhaduje ako pomer rýchlostných konštánt vychytávania (k_1) a depurácie (k_2) podľa kinetiky prvého rádu ([2]).

Ak sa ustálený stav do 28 dní nedosiahne, tak sa buď vypočíta BCF použitím kinetického prístupu (pozri bod 38), alebo sa môže predĺžiť vychytávacia fáza. Ak by to znamenalo príliš dlhú vychytávaciu fázu, ktorá sa v praxi nedá na dosiahnutie ustáleného stavu uskutočniť, (pozri body 37 a 38, dodatok 5), uprednostní sa kinetický prístup. Alternatívne sa v prípade vysoko hydrofóbnych látok môže zvážiť vykonanie skúšky expozície z potravy ([3]) za predpokladu, že je táto skúška v súlade s príslušným regulačným rámcom.

Na základe modelu, ktorý najlepšie opisuje namerané koncentrácie testovanej látky v rybách a vo vode, sa vypočíta rýchlostná konštanta vychytávania, rýchlostná koncentrácia (vylučovania) depurácie (alebo rýchlostné konštanty v prípade komplexnejších modelov), biokoncentračný faktor (v ustálenom stave a/alebo kinetický) a tam, kde je to možné, aj intervaly spoľahlivosti každého z týchto parametrov (pozri dodatok 5).

Nárastom hmotnosti rýb počas skúšky dôjde k zníženiu koncentrácie testovanej látky v rastúcich rybách (tzv. znižovanie koncentrácie látky vplyvom rastu), a tým aj k podhodnoteniu kinetického BCF, ak sa jeho hodnota neupraví o rast (pozri body 72 a 73).

BCF je založený na celkovej koncentrácii v rybách (t. j. na celkovej vlhkej hmotnosti rýb). Z osobitných dôvodov sa však môžu v prípadoch dostatočnej veľkosti rýb niekedy použiť určené tkanivá alebo orgány (napríklad sval, pečeň), alebo sa môžu ryby rozdeliť na jedlé (rezy) alebo nejedlé časti (vnútornosti). Pretože pri mnohých organických látkach sa pozoruje jasná súvislosť medzi ich biokoncentračným potenciálom a hydrofóbnosťou, existuje aj príslušná súvislosť medzi obsahom lipidov v testovaných rybách a pozorovanou biokoncentráciou

([1]) Pri väčšine testovaných látok by v ideálnom prípade mala byť voda s kontrolnou skupinou bez nálezov. Pozaďové koncentrácie by mali byť relevantné iba v prípade prirodzene zastúpených materiálov (napr. niektorých kovov) a látok, ktoré sú v životnom prostredí všadeprítomné.

([2]) V prípade zjavného nedodržania kinetiky prvého rádu treba použiť komplexnejšie modely (pozri odkazy na literatúru v *dodatku 5*) a poradiť sa s bioštatistikom.

([3]) Pri skúške biokoncentrácie sa vychytávanie môže nízkymi expozičnými koncentráciami z dôvodu nízkej rozpustnosti vo vode obmedziť, kým skúškou expozície z potravy možno dosiahnuť ďaleko vyššie expozičné koncentrácie.

▼M7

týchto látok. V záujme obmedzenia zdroja tejto variability výsledkov testovania dosahovaných s vysokolipofilnými látkami (t. j. s log K_{OW} > 3) by sa preto biokoncentrácia rýb mala okrem vyjadrenia v podobe hodnoty získanej priamo zo štúdie aj normalizovať, a to podľa rýb s obsahom lipidov 5 % (na základe vlhkej hmotnosti celého tela). Tým sa získa základ, ku ktorému sa budú vzájomne prirovnávať výsledky dosiahnuté s rôznymi látkami a/alebo testovanými druhmi. Hodnota obsahu lipidov 5 % sa všade používa preto, že predstavuje priemerný obsah lipidov u rýb bežne používaných v tejto testovacej metóde (21).

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

Okrem vlastností testovanej látky uvedených v úvode (bod 3) sú ďalšími požadovanými informáciami toxicita u druhov rýb, ktoré sa majú testovať, najlepšie ako asymptotická LC_{50} (t. j. nezávislá od času) a/alebo odhadovaná toxicita z dlhodobých testov s rybami [napr. testovacie metódy C.47 (22), C.15 (23), C.14 (24)].

Na kvantifikáciu látky v testovaných roztokoch a v biologickom materiáli by mala byť k dispozícii primeraná analytická metóda so známou presnosťou a spoľahlivosťou, ako aj s údajmi o príprave a skladovaní vzorky. Okrem toho treba poznať analytický kvantifikačný limit testovanej látky tak vo vode, ako aj v rybích tkanivách. Ak sa ako testovaná látka použije látka označená rádioaktívnym izotopom, mala by mať najvyššiu možnú čistotu (podľa možnosti napr. > 98 %), pričom by malo byť známe aj percento rádioaktivity v súvislosti s nečistotami.

PLATNOSŤ TESTU

Na účely platnosti testu sa musia dodržať tieto podmienky:

teplota vody nesmie kolísať viac ako ± 2 °C, pretože veľké odchýlky môžu ovplyvniť biologické parametre vychytávania a depurácie a spôsobovať zvieratám stres,

koncentrácia rozpusteného kyslíka nesmie klesnúť pod 60 % saturácie,

koncentrácia testovanej látky v komorách sa musí udržiavať v rozmedzí ± 20 % priemeru hodnôt nameraných počas vychytávacej fázy,

koncentrácia testovanej látky je pod hranicou maximálnej rozpustnosti vo vode, ak sa vezme do úvahy účinok, ktorý môže mať testovaná vody na efektívnu rozpustnosť ([1]),

úmrtnosť alebo iné nepriaznivé vplyvy/choroby sú na konci testu v skupinách testovaných i kontrolných rýb nižšie ako 10 %, pri trvaní testu počas niekoľkých týždňov alebo mesiacov by mal byť úhyn alebo iné nepriaznivé javy v prípade obidvoch skupín rýb nižší ako 5 % za týždeň a celkovo nemal by presiahnuť 30 %. Výrazné rozdiely v priemernom raste medzi testovanými a kontrolnými skupinami rýb zo vzorky by mohli byť signálom toxického účinku testovanej látky.

REFERENČNÉ LÁTKY

Použitie referenčných látok so známym biokoncentračným potenciálom a nízkym metabolizmom by pomohlo pri kontrole experimentálneho postupu, ak sa vyžaduje (napr. ak laboratórium nemá žiadne predchádzajúce skúsenosti s testom alebo došlo k zmene podmienok pokusu).

([1]) V prípade mnohozložkových látok, UVCB a zmesí by sa pri určovaní vhodných expozičných koncentrácií mala zvážiť rozpustnosť každej zo zastúpených zložiek vo vode.

▼M7

OPIS METÓDY

Prístrojové vybavenie

Pri všetkých súčastiach zariadení sa treba vyhýbať používaniu materiálov, ktoré sa môžu rozpúšťať, absorbovať a lúhovať a ktoré môžu mať na ryby nepriaznivé účinky. Možno používať bežné nádrže pravouhlého alebo valcovitého tvaru z vhodného materiálu a takej veľkosti, ktorá zodpovedá veľkosti násady rýb (pozri bod 43). Pokiaľ možno, treba sa vyhýbať používaniu hadičiek a rúrok z mäkkých plastov. Mali by sa použiť rúrky z polytetrafluóretylénu, nehrdzavejúcej ocele a/alebo zo skla. Zo skúseností vyplýva, že pri testovaných látkach s vysokým adsorpčným koeficientom (napríklad pri syntetických pyretroidoch) môže byť potrebné používať posilanizované sklo. V takýchto prípadoch by sa toto zariadenie malo po použití zlikvidovať. Je vhodné, aby boli testované systémy ešte pred použitím testovaných organizmov vystavené účinkom koncentrácií testovanej látky, ktorá sa má použiť pri štúdii, a to tak dlho, ako je potrebné na preukázanie udržania stabilných expozičných koncentrácií.

Voda

Pri testoch sa vo všeobecnosti používa prírodná voda, ktorá by sa mala získavať z nekontaminovaných zdrojov s jednotnou kvalitou. Napriek tomu môže byť na zaručenie rovnakej kvality v čase vhodnejšia rekonštituovaná voda (t. j. demineralizovaná voda s pridanými špecifickými živinami v známych množstvách). Voda na riedenie je voda, ktorá sa zmieša s testovanou látkou pred tým, ako sa pridá do testovacej nádoby (pozri bod 30), a mala by mať takú kvalitu, aby v nej druh rýb, ktorý sa má použiť v teste, mohol prežiť fázy aklimatizácie a testu bez toho, aby vykazoval znaky abnormálneho vzhľadu alebo správania. V ideálnom prípade treba preukázať, že testovaný druh dokáže vo vode na riedenie prežívať, rásť a rozmnožovať sa (napríklad pomocou testu v laboratórnej kultúre alebo testu toxicity pre životný cyklus). Vodu na riedenie treba charakterizovať najmenej z hľadiska pH, tvrdosti, celkového obsahu tuhých látok a celkového organického uhlíka (TOC ([1])) a pokiaľ možno aj obsahu amoniaku, dusitanov, ako aj z hľadiska zásaditosti a pri morských druhoch aj slanosti. Hoci parametre, ktoré sú potrebné na zaručenie optimálnych životných podmienok rýb, nie sú celkom známe, v dodatku 2 sú uvedené odporúčané maximálne koncentrácie celého radu parametrov charakterizujúcich sladkú aj morskú vodu.

Voda na riedenie by mala mať konštantnú kvalitu počas celého trvania testu. Hodnota pH by sa mala pohybovať v rozmedzí 6,0 až 8,5 na začiatku testu, no počas príslušného testu by nemala kolísať o viac ako ± 0,5 jednotiek pH. Aby voda na riedenie neovplyvňovala neprimeraným spôsobom výsledky testovania (napríklad vytváraním komplexov s testovanou látkou) alebo aby nemala nepriaznivý vplyv na stav násady rýb, je potrebné zabezpečiť v pravidelných intervaloch – aspoň na začiatku a konci testu – odber vzoriek na analýzu. Ak je známe, že voda na riedenie má relatívne konštantnú kvalitu, mala by sa, napr. každé tri mesiace, zisťovať prítomnosť ťažkých kovov (napr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd a Ni), hlavných aniónov a katiónov (napr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, a SO_4^{2-}), pesticídov (napr. celkové organofosforečné a celkové organochlórové pesticídy) celkového organického uhlíka a tuhých suspendovaných látok. Ak sa preukázalo, že kvalita vody na riedenie bola konštantná najmenej jeden rok, spomínané zisťovanie sa môže vykonávať menej často a vo väčších časových rozostupoch (napr. každých šesť mesiacov).

Obsah prirodzených tuhých častíc, ako aj celkového organického uhlíka vo vode na riedenie by mal byť čo možno najnižší, aby sa zabránilo absorpcii testovanej látky na organickú hmotu, v dôsledku čoho by sa mohla znížiť jej biologická dostupnosť, ktorá by viedla k podhodnoteniu BCF. Maximálny prípustný obsah

([1]) TOC sa skladá z organického uhlíka z častíc a rozpusteného organického uhlíka, *t. j.* TOC = POC + DOC.

▼M7

tuhých častíc je 5 mg/l (sušina zachytená na 0,45 μm filter) a celkového organického uhlíka 2 mg/l (pozri dodatok 2). V prípade potreby treba vodu na riedenie pred použitím filtrovať. Prírastok obsahu organického uhlíka spôsobený v testovanej vode z testovaných rýb (exkrementy) a zo zvyškov krmiva by sa mal pokiaľ možno minimalizovať (pozri bod 46).

Testovacie roztoky

Pripravte zásobný roztok testovanej látky s vhodnou koncentráciou. Zásobný roztok treba podľa možnosti pripraviť jednoduchým zmiešaním alebo trepaním testovanej látky vo vode na riedenie. Alternatívne sa môže v niektorých prípadoch použiť dávkovací systém s desorpciou tuhej fázy. Použitie rozpúšťadiel alebo disperzných činidiel (solubilizačných prostriedkov) sa vo všeobecnosti neodporúča (pozri bod 25). Ich použitie však môže byť prijateľné, ak sa má získať zásobný roztok vhodnej koncentrácie; v tom prípade by sa ale malo vyvinúť maximálne úsilie na minimalizáciu ich použitia a zároveň zabránenie prekročenia kritickej hranice koncentrácie micel v nich (v relevantných prípadoch). Medzi rozpúšťadlá, ktoré možno použiť, patria acetón, etanol, metanol, dimetylformamid a trietylénglykol. Ako disperzné činidlá sa používajú Tween 80, 0,01 % metylcelulóza a HCO-40. Koncentrácia rozpúšťadla v konečnom testovacom médiu by mala byť pri všetkých pokusoch rovnaká (t. j. bez ohľadu na koncentráciu testovanej látky) a nemala by prekročiť zodpovedajúce hraničné hodnoty toxicity stanovené pre rozpúšťadlo v testovacích podmienkach. Maximálna koncentrácia je 100 mg/l (alebo 0,1 ml/l). Je nepravdepodobné, že by rozpúšťadlo s koncentráciou 100 mg/l výrazne zmenilo maximálnu koncentráciu rozpustenej testovanej látky, ktorú je možné v danom médiu dosiahnuť (25). Mal by byť známy prírastok z rozpúšťadla (spolu s testovanou látkou) k celkovému obsahu organického uhlíka v testovanej vode. Koncentrácia celkového organického uhlíka v testovacích nádobách by nemala počas celého trvania testu prekročiť koncentráciu organického uhlíka pochádzajúcu z testovanej látky a z rozpúšťadla, prípadne zo solubilizačného prostriedku ([1]), ak sa použil, a to o viac ako 10 mg/l (± 20 %). Obsah organických látok môže mať významný vplyv na množstvo voľne rozpustenej testovanej látky počas prietokových testov na rybách, zvlášť v prípade vysokolipofilných látok. Mikroextrakcia tuhej fázy (pozri bod 60) môže poskytnúť dôležité informácie o pomere medzi viazanými a voľne rozpustenými zlúčeninami, pričom voľne rozpustené zlúčeniny sú považované za biologicky dostupnú frakciu. Koncentrácia testovanej látky by mala byť nižšia ako je maximálna rozpustnosť testovanej látky v testovacom médiu napriek tomu, že sa použilo rozpúšťadlo alebo solubilizačný prostriedok. Rozpúšťadlá, ktoré ľahko podliehajú biodegradácii, treba používať s opatrnosťou, pretože môžu v prietokových testoch spôsobovať problémy s množením baktérií. Ak sa zásobný roztok nedá pripraviť bez použitia solubilizačného prostriedku, malo by sa zvážiť, či by namiesto štúdie expozície z potravy nebolo vhodné vykonať štúdiu expozície vo vodnom prostredí.

Pri prietokových testoch je potrebné použiť systém nepretržitého prívodu a riedenia zásobného roztoku testovanej látky (napríklad meracie čerpadlo, prístroj na proporčné riedenie, saturačný systém) alebo dávkovací systém s desorpciou tuhej fázy, ktorým sa zabezpečí prívod testovacích koncentrácií do testovacích komôr. Ak sa dá, mal by sa objem každej testovacej komory denne aspoň päťkrát vymeniť. Treba uprednostniť prietokový systém, hoci tam, kde to nie je možné (napr. ak by to malo nepriaznivý vplyv na testované organizmy), sa môže pod podmienkou splnenia kritérií platnosti skúšky použiť aj polostatická metóda (pozri bod 24). Prietokovú rýchlosť zásobného roztoku aj vody na riedenie je potrebné skontrolovať 48 hodín pred začatím testu a potom najmenej raz denne počas celého jeho trvania. Pri tom treba skontrolovať aj rýchlosť prietoku cez každú testovaciu komoru a zabezpečiť, aby odchýlky prietoku v rámci komôr i medzi nimi nepresiahli 20 %.

([1]) Napriek tomu, že sa takéto použitie vo všeobecnosti neodporúča, tak v prípade, že sa použije rozpúšťadlo alebo solubilizačný prostriedok, mal by sa pri zisťovaní koncentrácie organického uhlíka v testovacích nádobách sčítať organický uhlík pochádzajúci z činidla s organickým uhlíkom z testovanej látky.

▼M7

Výber druhov

Pri výbere druhov sa treba riadiť týmito dôležitými kritériami: musia byť ľahko dostupné, možno ich získať vo vhodnej veľkosti a možno ich bez problémov chovať v laboratóriu. Ďalšie kritériá, ktoré treba pri výbere druhov rýb zohľadniť, sú: rekreačný, komerčný a ekologický význam, ako aj ich porovnateľná citlivosť, ich úspešné použitie v minulosti atď. Odporúčané testovacie druhy sú uvedené v dodatku 3. Možno použiť aj iné druhy, postup testovania však treba upraviť tak, aby sa dosiahli vhodné testovacie podmienky. V tomto prípade je potrebné zaznamenať dôvody, ktoré viedli k výberu iných druhov a experimentálnych metód. Vo všeobecnosti sa použitím menších druhov rýb skráti čas potrebný na dosiahnutie ustáleného stavu, ale možno bude treba viac rýb (vzoriek) na primeranú analýzu obsahu lipidov a koncentrácií testovanej látky v rybách. Porovnanie výsledkov medzi jednotlivými testami a testovanými druhmi môžu ovplyvniť aj rozdiely medzi mladými a staršími rybami v rýchlosti spotreby kyslíka a metabolizme. Treba poznamenať, že druhy rýb testované v (juvenilnej) životnej fáze vyznačujúcej sa rýchlym rastom môžu komplikovať interpretáciu údajov.

Chov rýb (na účely skúšky expozície vo vodnom prostredí a expozície z potravy)

Zásobná populácia rýb by sa mala aspoň dva týždne aklimatizovať vo vode (pozri bod 28) pri testovacej teplote a dostatočnom prísune potravy (pozri bod 45). Tak voda, ako aj potrava by mali byť zodpovedať typu, ktorý sa použije počas testu.

Po 48-hodinovej adaptačnej fáze sa zaznamená úmrtnosť a uplatnia tieto kritériá:

— ak úmrtnosť po siedmich dňoch prekračuje 10 % populácie: celá násada sa vyradí,

— ak sa úmrtnosť po siedmich dňoch pohybuje od 5 do 10 % populácie: obdobie aklimatizácie sa predĺži o ďalších sedem dní; ak je aj počas týchto siedmich dní úmrtnosť vyššia ako 5 %, celá násada sa vyradí,

— ak je úmrtnosť po siedmich dňoch pod 5 % populácie: násada sa akceptuje.

Ryby použité v testoch by mali byť bez zjavných chorôb a abnormalít. Všetky choré ryby treba zlikvidovať. Počas dvoch týždňov predchádzajúcich testu alebo počas testu by ryby nemali byť ošetrované v súvislosti s ochorením.

VYKONANIE TESTU

Predbežná skúška

Môže byť užitočné vykonať predbežný pokus v záujme optimalizácie podmienok hlavného testu ako napr. výber koncentrácie(-í) testovanej látky, dĺžka vychytávacej a depuračnej fázy alebo určenie potreby vykonať celý test, príp. iba jeho časť. Predbežná skúška by sa mala navrhnúť tak, aby bolo možné získať požadované informácie. Možno zvážiť aj to, či bude na stanovenie BCF stačiť minimálny test, alebo treba vykonať úplnú štúdiu (pozri body 83 až 95 o minimálnom teste).

Podmienky expozície

Dĺžka vychytávacej fázy

Prognózu dĺžky vychytávacej fázy možno získať z praktických skúseností (napr. z predchádzajúcej štúdie alebo zo súhrnnej štúdie látok s podobnou štruktúrou) alebo na základe istých empirických vzťahov vychádzajúcich buď z poznatkov o rozpustnosti vo vodnom prostredí alebo o rozdeľovacom koeficiente oktanol/voda testovanej látky (za predpokladu, že sa vychytávanie riadi kinetikou prvého rádu, pozri dodatok 5).

▼M7

Vychytávacia fáza by mala trvať 28 dní, ak sa nepreukáže, že ustálený stav bol dosiahnutý skôr (pozri dodatok 1, definície a jednotky). Ustálený stav nastane, ak sa na grafickom znázornení závislosti obsahu testovanej látky v rybe (C_f) od času stane daná krivka rovnobežnou s osou času a tri po sebe idúce analýzy C_f na vzorkách odobratých minimálne v dvojdňových intervaloch sa od seba neodlišujú o viac ako ± 20 % a ak v čase medzi prvou a poslednou z po sebe idúcich analýz nedošlo k žiadnemu výraznému zvýšeniu hodnoty C_f. Pri analyzovaní hromadných vzoriek sa musia vykonať najmenej štyri po sebe idúce analýzy. Pri testovaných látkach, ktoré sú vychytávané pomaly, je primeranejším intervalom sedem dní. Ak sa ustálený stav do 28 dní nedosiahne, tak sa buď vypočíta BCF použitím iba kinetického prístupu, ktorý nezávisí od dosiahnutia ustáleného stavu, alebo sa môže predĺžiť vychytávacia fáza, pričom až do dosiahnutia ustáleného stavu, alebo počas 60 dní, podľa toho, čo nastane skôr, sa uskutočňujú ďalšie merania. Takisto koncentrácia testovanej látky v rybe musí byť na konci vychytávacej fázy dostatočne vysoká, aby sa zabezpečil spoľahlivý odhad k_2 z depuračnej fázy. Ak sa po 28 dňoch nepreukáže žiadne významné vychytávanie, test sa môže ukončiť.

Dĺžka depuračnej fázy

V prípade látok, ktoré sa riadia kinetikou prvého rádu, na dosiahnutie primeraného zníženia (napríklad 95 %) zaťaženia organizmu testovanou látkou obyčajne postačuje polovičná dĺžka vychytávacej fázy (vysvetlenie k tomu odhadu je uvedené v dodatku 5). Ak je čas potrebný na 95 % vylúčenie testovanej látky z praktického hľadiska pridlhý a je napríklad dva razy dlhší ako trvanie vychytávacej fázy (t. j. viac ako 56 dní), potom možno použiť kratšie obdobie (napríklad kým koncentrácia testovanej látky nebude nižšia ako 10 % koncentrácie v ustálenom stave). Pri látkach s komplexnejšími vzorcami vychytávania a depurácie ako v prípade modelu ryby s jedným kompartmentom, ktorý sa riadi kinetikou prvého rádu, sa však pravdepodobne budú musieť použiť dlhšie depuračné časy. Ak sú takéto komplexné vzorce pozorované a/alebo očakávané, odporúča sa zabezpečenie náležitého skúšobného nastavenia konzultovať s biošta-tistikom a/alebo farmakokinetikom. Pri predlžovaní depuračnej fázy sa môže znižovať počet rýb na výber vzorky, pričom na výsledky môžu mať vplyv rozdiely v raste rýb. Toto obdobie bude sprevádzané ďalším obdobím, počas ktorého zostáva koncentrácia testovanej látky v rybách nad úrovňou analytického kvantifikačného limitu.

Počty testovaných rýb

Počty rýb na každú testovanú koncentráciu voľte tak, aby boli na každom mieste odberu vzoriek k dispozícii najmenej štyri ryby. Ryby by sa mali spájať do skupiny iba v prípade, že ich nemožno analyzovať samostatne. Ak sa chce dosiahnuť vyššia presnosť kreslenia krivky (a vypočítaných parametrov), alebo ak sú potrebné metabolické štúdie (napr. na účely odlíšenia metabolitov od materskej látky pri použití testovaných látok označených rádioaktívnym izotopom), bude musieť byť na každom mieste odberu viac rýb. Obsah lipidov by sa mal stanovovať v rovnakom biologickom materiáli, aký sa použil na stanovenie koncentrácie testovanej látky. Ak to nie je možné, môže byť potrebných viac rýb (pozri body 56 a 57).

Ak sa použijú dospelé (*t. j.* pohlavne zrelé) ryby, nemali by byť pred ani počas testu v štádiu neresenia alebo po nedávnom oplodnení (*t. j.* po neresení). Malo by sa tiež uviesť, či sú na pokus použité samce, samice alebo obe pohlavia. Pri použití oboch pohlaví by sa mali zaznamenávať rozdiely v raste a obsahu lipidov medzi pohlaviami s cieľom vylúčiť ich markantnosť, a to pred začiatkom expozície, zvlášť vtedy, ak sa predpokladá, že bude nevyhnutné samce a samice rýb umiestniť spoločne na zaručenie stanoviteľnosti koncentrácií látky a/alebo obsahu lipidov.

▼M7

Pri akomkoľvek teste vyberajte ryby podobnej hmotnosti tak, aby hmotnosť najmenšej z nich nebola menšia ako dve tretiny hmotnosti tej najväčšej. Všetky musia mať rovnaký vek a pochádzať z toho istého zdroja. Keďže vek a hmotnosť môžu výrazne ovplyvniť hodnoty BCF (12), mali by sa údaje o nich presne zaznamenať. Odporúča sa krátko pred začatím testu odvážiť časť vzorky populácie rýb, aby sa odhadla priemerná hmotnosť (pozri bod 61).

Násada

Mal by sa použiť vysoký pomer množstva vody k množstvu rýb tak, aby sa minimalizovalo znižovanie koncentrácie testovanej zlúčeniny vo vode spôsobené pridaním rýb na začiatku testu a aby sa zabránilo poklesu koncentrácie rozpusteného kyslíka. Je dôležité, aby veľkosť násady zodpovedala použitému druhu rýb. V každom prípade sa však odporúča zvyčajná veľkosť násady v rozmedzí 0,1 do 1,0 g ryby (vlhká hmotnosť) na liter vody za deň. Možno použiť aj vyšší pomer množstva vody k množstvu rýb, ak možno zabezpečiť udržiavanie požadovanej koncentrácie testovanej látky v rozmedzí povolených výkyvov ± 20 % a koncentrácia rozpusteného kyslíka pritom neklesne pod 60 % saturácie (pozri bod 24).

Pri výbere primeraných režimov nasadzovania vezmite do úvahy bežné prirodzené prostredie daného druhu. Napríklad ryby žijúce pri dne môžu v porovnaní s druhmi žijúcimi pri hladine vyžadovať väčšiu plochu dna nádrže pri rovnakom objeme vody.

Kŕmenie

Počas aklimatizačnej a testovacej fázy kŕmte ryby vhodnou potravou so známym obsahom lipidov a celkovým obsahom bielkovín v množstve dostatočnom na udržanie rýb v dobrom zdravotnom stave a pri stabilnej telesnej hmotnosti (určitý nárast hmotnosti je povolený). Počas aklimatizačnej a testovacej fázy ich kŕmte denne dávkou stanovenou v závislosti od použitých druhov, experimentálnych podmienok a kalorickej hodnoty potravy (napríklad v prípade pstruha dúhového približne medzi 1 až 2 % telesnej hmotnosti denne). Kŕmne dávky treba zvoliť tak, aby sa zabránilo rýchlemu rastu a prílišnému zvýšeniu obsahu lipidov. V snahe zachovať kŕmne dávky by sa podľa potreby, napr. raz týždenne, malo množstvo krmiva opätovne prepočítať. Na účely takéhoto výpočtu možno hmotnosť rýb nachádzajúcich sa v každej testovacej komore odhadnúť na základe hmotnosti rýb odobratých z danej komory pri poslednom odbere vzoriek. Neodporúča sa váženie rýb, ktoré zostávajú v pokusnej komore.

Neskonzumovaná potrava a výkaly by sa mali z testovacej komory denne odsávať, a to krátko po skončení kŕmenia (do 30 minút až jednej hodiny). Testovacie komory by sa počas celého testu mali udržiavať v čo najčistejšom stave, aby sa pokiaľ možno čo najviac minimalizovala koncentrácia organickej hmoty (pozri bod 29), keďže prítomnosť organického uhlíka môže obmedzovať biodostupnosť testovanej látky (12).

Keďže mnohé krmivá obsahujú rybiu múčku, malo by sa zabezpečiť, aby krmivo neovplyvňovalo výsledky testu, ani nevyvolávalo nepriaznivé účinky napr. obsahom (zvyškov) pesticídov, ťažkých kovov a/alebo samotnej testovanej látky.

Svetlo a teplota

Odporúča sa fotoperióda v rozpätí od 12 do 16 hodín, pričom teplota (± 2 °C) by mala byť vhodná pre dané testované druhy (pozri dodatok 3). Mal by byť známy typ osvetlenia a jeho vlastnosti Treba zachovávať opatrnosť z hľadiska možnej fototransformácie testovanej látky pod vplyvom svetelných podmienok štúdie. Treba udržiavať primerané osvetlenie, aby sa ryby nevystavovali účinkom neprirodzených fotoproduktov. V niektorých prípadoch môže byť potrebné používať filter na elimináciu ultrafialového žiarenia s vlnovou dĺžkou nižšou ako 290 nm.

▼M7

Testované koncentrácie

Tento test bol pôvodne navrhnutý pre nepolárne organické látky. Očakáva sa, že pri tomto type látok bude stačiť, ak sa ryba vystaví účinkom jedinej koncentrácie, keďže sa neočakávajú žiadne účinky koncentrácie. Príslušný regulačný rámec si však môže vyžadovať dve koncentrácie. Ak sa testujú látky, ktoré nepatria do tejto oblasti, alebo ak sú známe iné znaky možnej závislosti od koncentrácie, test by sa mal uskutočniť s dvomi alebo viacerými koncentráciami. Ak sa testuje iba jedna koncentrácia, malo by sa použitie jednej koncentrácii odôvodniť (pozri bod 79). Testovaná koncentrácia by mala byť zároveň prakticky alebo technicky čo najnižšia (t. j. nie blízko limitu (maximálnej) rozpustnosti).

V niektorých prípadoch možno očakávať, že biokoncentrácia látky bude závisieť od koncentrácie vo vode (napr. v prípade kovov, ktorých vychytávanie rybami možno aspoň čiastočne regulovať). V takom prípade treba testovať najmenej dve, no podľa možnosti viac koncentrácií (pozri bod 49), ktoré sú relevantné z hľadiska životného prostredia. Testovanie najmenej dvoch koncentrácií sa odporúča aj pri látkach s testovanými koncentráciami, ktoré musia byť z praktických dôvodov tesne pod hranicou maximálnej rozpustnosti, pretože to pomôže získať prehľad o spoľahlivosti expozičných koncentrácií. Výber testovaných koncentrácií by mal zahŕňať realistické koncentrácie v životnom prostredí, ako aj koncentrácie, ktoré majú pre toto špecifické hodnotenie význam.

Koncentrácia, resp. koncentrácie testovanej látky by sa mali vyberať tak, aby boli nižšie ako hodnota ich chronického účinku alebo 1 % ich akútnej asymptotickej hodnoty LC_{50} a aby boli v rozpätí bežnom pre životné prostredie a minimálne rádovo vyššie ako limit ich kvantifikácie vo vode použitou analytickou metódou. Najvyššiu prípustnú testovanú koncentráciu možno stanoviť aj vydelením hodnoty akútnej 96-hodinovej LC_{50} príslušným pomerom akútnej/chronickej koncentrácie (napr. v prípade niektorých látok môže byť príslušný pomer okolo tri, inde aj viac ako 100). Ak sa použije druhá koncentrácia, mala by sa od prvej odlišovať o faktor desať. Ak to nedovoľuje kritérium toxicity (ktoré limituje vyššiu testovanú koncentráciu) a analytický limit (ktorý limituje nižšiu testovanú koncentráciu), môže sa použiť aj nižší faktor ako desať a zvážiť použitie testovanej látky označenej rádioaktívnym izotopom (najvyššej čistoty, podľa možnosti napr. > 98 %). Treba dbať na to, aby sa nepoužila koncentrácia prekračujúca maximálnu rozpustnosť testovanej látky v testovanom médiu.

Kontroly

Okrem sérií testov by sa mala vykonať aj jedna kontrola s vodou na riedenie, alebo v prípade potreby (pozri body 30 a 31) jedna kontrola s obsahom rozpúšťadla.

Frekvencia meraní kvality vody

Počas testu by sa vo všetkých testovacích a kontrolných nádobách mal zmerať obsah rozpusteného kyslíka, TOC, pH a teplota. Celkovú tvrdosť vody a (v prípade potreby) slanosť treba zmerať v kontrole, resp. kontrolách a v jednej nádobe. Ak sa testujú dve alebo viaceré koncentrácie, uvedené parametre merajte pri vyššej (alebo najvyššej) koncentrácii. Množstvo rozpusteného kyslíka a (v prípade potreby) slanosť by sa v priebehu vychytávacej fázy mali merať minimálne trikrát – na jej začiatku, približne v strede a na konci – a raz týždenne v priebehu depuračnej fázy. TOC by sa mal zmerať na začiatku testu (24 a 48 hodín pred spustením vychytávacej fázy) pred pridaním rýb a najmenej raz týždenne počas vychytávacej i depuračnej fázy. Teplota by sa mala merať a zaznamenávať denne, pH na začiatku a na konci každého obdobia a tvrdosť raz počas každého testu. Aspoň v jednej nádrži by sa malo zabezpečiť kontinuálne meranie teploty.

▼M7

Odber a analýza vzoriek rýb a vody

Harmonogram odberu vzoriek rýb a vody

Vzorky vody na stanovenie koncentrácie testovanej látky by sa z testovacích nádrží mali odobrať pred pridaním rýb a počas vychytávacej i depuračnej fázy. Vzorky vody by sa z nich mali odobrať pred kŕmením a v rovnakom čase ako vzorky rýb. Na zaručenie stabilných koncentrácií po nasadení rýb môže byť užitočný intenzívnejší odber vzoriek. Koncentrácie testovanej látky by sa mali určiť vo vychytávacej fáze, aby sa overil súlad s validačnými kritériami(bod 24). Ak sa analýzou vzoriek vody na začiatku depuračnej fázy preukáže, že testovaná látka nebola zistená, môže sa tým odôvodniť absencia ďalších meraní testovanej látky v testovanej a kontrolnej vode po zvyšok depuračnej fázy.

V súvislosti s testovanou látkou by sa mali vzorky rýb v priebehu vychytávacej fázy odobrať najmenej päťkrát a v priebehu depuračnej fázy najmenej štyrikrát. Keďže v niektorých prípadoch nebude jednoduché vypočítať dostatočne presný odhad hodnoty BCF na základe tohto počtu vzoriek (najmä v prípadoch, ak počas vychytávacej a depuračnej fázy pôjde o inú ako jednoduchú kinetiku prvého rádu), odporúča sa odoberať vzorky v oboch fázach častejšie (pozri dodatok 4).

Obsah lipidov by sa mal stanovovať aspoň na začiatku a na konci vychytávacej fázy a na konci depuračnej fázy, a to v rovnakom biologickom materiáli, aký sa použil na stanovenie koncentrácie testovanej látky. Ak to nie je možné, mali by sa odobrať vzorky aspoň z troch nezávislých rýb, aby sa stanovil obsah lipidov v každom z tých troch časov odberu. Počet rýb v každej nádrži by sa mal na začiatku pokusu zodpovedajúcim spôsobom upraviť ([1]). Ako alternatíva v prípade, že v kontrolnej skupine rýb (t. j. rýb zo zásobnej populácie) nebolo zistené žiadne významné množstvo testovanej látky, sa môže obsah lipidov testovať iba u rýb z kontrolnej skupiny, pričom sa analýza testovanej látky v testovanej skupine, resp. skupinách (a s ňou súvisiace hodnoty rýchlostnej konštanty vychytávania, rýchlostnej konštanty depurácie a BCF) môže upraviť tak, aby počas testu zohľadňovala zmeny obsahu lipidov v kontrolnej skupine ([2]).

Uhynuté alebo choré ryby by sa nemali analyzovať ani na testovanú látku, ani na koncentráciu lipidov.

Príklad prijateľného harmonogramu odberu vzoriek je uvedený v dodatku 4. Podobne možno vypočítať aj iné harmonogramy pomocou iných predpokladaných hodnôt K_{OW}, z ktorých sa vypočíta expozičný čas potrebný na dosiahnutie 95 % vychytávania (výpočty sú uvedené v dodatku 5).

Odber vzoriek vo fáze vychytávania by mal pokračovať až do dosiahnutia ustáleného stavu (pozri dodatok 1, definície a jednotky), alebo kým sa vychytávacia fáza neukončí iným spôsobom (po 28 alebo 60 dňoch, pozri body 37 a 38). Pred začatím depuračnej fázy by sa mali ryby premiestniť do čistých nádob.

Odber a príprava vzoriek

Vzorky vody na analýzu by sa mali odoberať napríklad odsávaním pomocou inertnej hadičky zo stredu testovacej komory. Biologicky nedostupná frakcia testovanej látky sa nedá vždy oddeliť od biodostupnej frakcie filtráciou či odstredením. Ak sa použije separačná metóda, mala by sa v skúšobnom protokole vždy odôvodniť alebo validovať vzhľadom na ťažkosti s biodostupnosťou (25). Najmä pri vysokohydrofóbnych látkach (t. j. látky s log K_{OW} > 5) (12) (26), pri ktorých by mohlo dôjsť k ich adsorpcii na mriežku filtra alebo odstreďovacie nádoby, by

([1]) Ak sa obsah lipidov neanalyzuje u tých istých rýb ako testovaná látka, ryby by mali mať aspoň podobnú hmotnosť a (v prípade potreby) aj rovnaké pohlavie.

([2]) Táto alternatíva platí iba vtedy, ak sú ryby zo všetkých testovaných skupín držané v skupinách podobných veľkostí, sú odobrané rovnakým postupom a kŕmené rovnakým spôsobom. Tým sa zabezpečí, že rast rýb vo všetkých testovaných skupinách bude v prípade testovaných koncentrácií pod úrovňou toxicity podobný. Ak je rast podobný, možno očakávať, že podobný bude aj obsah lipidov. Rozdielny rast v kontrolnej skupine by znamenal účinok látky a štúdia by sa stala neplatnou.

▼M7

sa vzorky nemali upravovať uvedenými spôsobmi. Namiesto toho by sa mali prijať opatrenia, ktorými sa zabezpečí, že nádrže zostanú v čo najväčšej miere čisté (pozri bod 46), pričom obsah celkového organického uhlíka by sa mal monitorovať tak vo vychytávacej, ako aj depuračnej fáze (pozri bod 53). Aby sa predišlo prípadným problémom so zníženou biodostupnosťou, mali by sa v prípade málorozpustných a vysokohydrofóbnych látok použiť na odber vzoriek techniky mikroextrakcie tuhej fázy.

Ryby z odobratej vzorky by sa mali okamžite usmrtiť tým najvhodnejším a najhumánnejším spôsobom (pri meraniach celých rýb by sa okrem opláchnutia vodou (pozri bod 28) a dôkladného osušenia nemali vykonať žiadne ďalšie postupy). Ryby odvážte a odmerajte ich celkovú dĺžku ([1]). Pri každej jednej rybe by sa nameraná hmotnosť a dĺžka mala dať do súvislosti s koncentráciou analyzovanej látky (a v prípade potreby aj s obsahom lipidov), napr. označením každej ryby zo vzorky jedinečným identifikátorom.

Voda aj ryby by sa mali analyzovať podľa možnosti ihneď po odbere, čím sa predíde degradácii alebo iným stratám a umožní výpočet približných rýchlostných konštánt vychytávania a depurácie v priebehu testu. Okamžitou analýzou sa predíde aj oddialeniu stanovenia dosiahnutia „plató“ (ustáleného stavu).

Ak sa analýza neurobí okamžite, vzorky by sa mali vhodným spôsobom uskladniť. Pred začatím štúdie by sa mali získať informácie o správnom spôsobe skladovania v prípade danej testovanej látky – napríklad hlbokým zmrazením, udržiavaním pri teplote 4 °C, extrakciou atď. Dĺžka skladovania by sa mala zvoliť tak, aby látka počas skladovania nedegradovala.

Kvalita analytickej metódy

Celý postup v zásade závisí od správnosti, presnosti a citlivosti metódy použitej na analýzu testovanej látky. Treba preto experimentálne overiť, či sú správnosť, presnosť a reprodukovateľnosť analýzy látky, ako aj úroveň výťažnosti testovanej látky tak z vody, ako aj z rýb pri danej metóde uspokojivé. Malo to byť súčasťou predbežných testov. Zároveň treba overiť, či testovaná látka nie je prítomná v použitej vode na riedenie. V prípade potreby sa hodnoty koncentrácie testovanej látky vo vode a v rybách získané z testu opravia tak, aby zohľadňovali hodnoty výťažnosti a pozaďové hodnoty z kontrol. So vzorkami rýb aj vody by sa počas celého testovania malo zaobchádzať tak, aby sa minimalizovala kontaminácia a straty (vznikajúce napríklad v dôsledku adsorpcie na zariadenie slúžiace na odber vzoriek).

Analýza vzoriek rýb

V prípade použitia materiálov označených rádioaktívnym izotopom možno analyzovať celé množstvo označenej látky (t. j. materskú zlúčeninu a jej metabolity) alebo je možné vzorky prečistiť tak, aby sa materská látka dala analyzovať osobitne. Ak má BCF vychádzať z materskej látky, mali by sa minimálne na konci vychytávacej fázy určiť hlavné metabolity (pozri bod 6). Hlavné metabolity sú tie, ktoré predstavujú ≥ 10 % z celkového množstva rezíduí v tkanivách rýb, tie, ktoré predstavujú ≥ 5 % z dvoch za sebou nasledujúcich bodov odberu vzoriek, tie, ktoré vykazujú zvýšené hladiny vo vychytávacej fáze, ako aj tie, pri ktorých je známe toxikologické riziko. Ak hodnota BCF celých rýb vyjadrená z hľadiska celkového množstva rezíduí označených rádioaktívnym izotopom dosiahne ≥ 500, môže byť žiaduce – a v prípade určitých kategórií látok, ako

([1]) Okrem hmotnosti by sa mala zaznamenať aj celková dĺžka, pretože porovnanie prírastku dĺžky počas testu je dobrým ukazovateľom toho, či nedošlo k nežiaducemu účinku.

▼M7

sú pesticídy, sa to dôrazne odporúča – hlavné metabolity identifikovať a kvantifikovať. Kvantifikáciu týchto metabolitov môžu vyžadovať aj niektoré regulačné orgány. Po identifikácii a kvantifikácii degradačných produktov, ktoré predstavujú v rybích tkanivách ≥ 10 % celkového množstva rezíduí označených rádioaktivnym izotopom, sa odporúča aj ich identifikácia a kvantifikácia v testovanej vode. Ak to nie je možné, malo by sa to vysvetliť v protokole.

Koncentráciu testovanej látky je zvyčajne potrebné stanoviť v každej jednej odváženej rybe. Ak to nie je možné, môžu sa pri každom odbere vzorky zhromaždiť napriek tomu, že sa tým obmedzia štatistické postupy, ktoré možno použiť pri spracúvaní údajov, a preto by mal byť do testu zaradený adekvátny počet rýb, ktorý umožní plánované zhromažďovanie vzoriek, štatistický postup a výpočet sily testu. Odkazy na literatúru (27) a (28) sa môžu použiť ako úvod k príslušným postupom zhromažďovania vzoriek.

BCF by sa mal okrem vyjadrenia v podobe hodnoty vypočítanej priamo zo štúdie (pozri bod 21) aj normalizovať, a to podľa rýb s obsahom lipidov 5 % (podľa vlhkej hmotnosti), okrem prípadov, keď možno tvrdiť, že testovaná látka sa neakumuluje primárne v lipidoch. Ak je to možné, mal by sa obsah lipidov v rybách stanoviť pri každom odbere vzoriek, najlepšie z rovnakého extraktu, ktorý bol pripravený na analýzu testovanej látky, pretože lipidy sa musia často z extraktu odstrániť skôr, ako ich bude možné analyzovať chromatografiou. Analýza testovaných látok si však často vyžaduje špecifické extrakčné postupy, ktoré by mohli byť v rozpore s testovacími metódami na stanovovanie lipidov. V takom prípade (kým nebudú k dispozícii vhodné nedeštruktívne inštrumentálne metódy) sa odporúča použiť inú stratégiu stanovenia obsahu lipidov v rybách (pozri bod 56). Na stanovenie obsahu lipidov by sa mali použiť vhodné metódy (20). Ako štandardnú metódu (30) je možné odporučiť techniku extrakcie chloroformom/metanolom (29), no ako alternatívna technika sa odporúča aj Smedesova metóda (31). Táto metóda je charakterizovaná porovnateľnou účinnosťou extrakcie, vysokou mierou správnosti, používaním menej toxických organických rozpúšťadiel a jednoduchým postupom. Môžu sa použiť aj iné metódy, ktorých správnosť možno spoľahlivo porovnať s odporúčanými metódami, ich použitie však treba riadne odôvodniť. Je dôležité uviesť podrobné informácie o použitej metóde.

Meranie rastu rýb

Na začiatku testu sa musí jednotlivo odvážiť päť až desať rýb zo zásobnej populácie a zmerať ich celková dĺžka. Môže ísť o tie isté ryby, ktoré sa použili na analýzu lipidov (pozri bod 56). Hmotnosť a dĺžka rýb použitých pre každý prípad odberu vzoriek z testovaných i kontrolných skupín by sa mali merať pred chemickou a analýzou obsahu lipidov. Merania na týchto vzorkách rýb možno použiť na odhad hmotnosti a dĺžky rýb, ktoré zostanú v testovacích a kontrolných nádržiach (pozri bod 45).

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Spracovanie výsledkov

Vychytávacia krivka testovanej látky by sa mala získať grafickým znázornením koncentrácie v/na rybách (alebo určenom tkanive) počas vychytávacej fázy v závislosti od času na aritmetických osiach. Ak krivka dosiahne plató, t. j. ak sa stane približne asymptotická k časovej osi, potom možno hodnotu BCF v ustálenom stave (BCF_{SS}) vypočítať takto:

$$\frac{C_f \text{ v ustálenom stave(priemer)}}{C_w \text{ v ustálenom stave(priemer)}}$$

▼M7

Vývoj hodnoty C_f môže byť ovplyvnený rastom rýb (pozri body 72 a 73). Priemerná expozičná koncentrácia (C_W) je ovplyvňovaná zmenami v čase. Možno očakávať, že časovo vážený priemer koncentrácií je pri štúdiách bioakumulácie presnejší a relevantnejší aj vtedy, keď je odchýlka v primeranom validačnom rozsahu (pozri bod 24). Časovo vážený priemer (TWA) koncentrácie vo vode sa môže vypočítať podľa oddielu 1 v dodatku 5.

Kinetický biokoncentračný faktor (BCF_K) by sa mal stanoviť ako pomer k_1/k_2, t. j. rýchlostných konštánt kinetiky prvého rádu. Rýchlostné konštanty k_1 a k_2, ako aj hodnota BCF_K sa môžu vypočítať súčasným dosádzaním hodnôt vychytávacej i depuračnej fázy. Ako alternatíva možno hodnoty k_1 a k_2 možno určiť aj sekvenčne (opis a porovnanie týchto metód sú uvedené v dodatku 5). Rýchlostná konštanta depurácie (k_2) si môže vyžadovať opravu tak, aby zohľadňovala znižovanie koncentrácie látky vplyvom rastu (pozri body 72 a 73). Ak sa vychytávacia a/alebo depuračná krivka zjavne neriadi kinetikou prvého rádu, mali by sa použiť komplexnejšie modely (pozri dodatok 5 a poraďte sa s bioštatistikom a/alebo s farmakokinetikom).

Údaje o hmotnosti/dĺžke rýb

Vlhká hmotnosť a celková dĺžka jednotlivých rýb pri všetkých intervaloch odberu vzoriek vo vychytávacej a depuračnej fáze sa uvedú do tabuľky zvlášť pre testovanú a zvlášť pre kontrolnú skupinu (vrátane zásobnej populácie určenej na začiatok vychytávania). Pri každej jednej rybe by sa nameraná hmotnosť a dĺžka mali dať do súvislosti s koncentráciou analyzovanej chemikálie napr. označením každej ryby zo vzorky jedinečným identifikátorom. Preferovaným meradlom rastu na účely opravy hodnôt kinetického BCF tak, aby zohľadňovali znižovanie koncentrácie látky vplyvom rastu (metóda opravy údajov na základe znižovania koncentrácie látky vplyvom rastu ryby je uvedená v bode 73 a v dodatku 5), je hmotnosť.

Oprava na základe znižovania koncentrácie látky vplyvom rastu a normalizácia lipidov

Rast rýb počas depuračnej fázy môže znížiť merané chemické koncentrácie v rybách, a tým spôsobiť, že celková hodnota rýchlostnej konštanty depurácie (k_2) bude vyššia ako pri samotných procesoch odbúravania (napr. dýchaním, metabolizmom, vylúčením). Kinetické biokoncentračné faktory by sa mali opraviť tak, aby zohľadňovali znižovanie koncentrácie látky vplyvom rastu. Rast ovplyvňuje aj hodnotu BCF_{SS}, neexistuje však žiadny schválený postup na opravu hodnoty BCF_{SS} podľa rastu. V prípadoch výrazného rastu by sa mala vypočítať aj hodnota BCF_K opravená o rast (BCF_{Kg}), pretože môže byť vhodnejším meradlom ako biokoncentračný faktor. Obsah lipidov v testovaných rybách (ktorý úzko súvisí s bioakumuláciou hydrofóbnych látok) môže v skutočnosti kolísať tak, že bude potrebné normalizovať stanovený obsah lipidov v rybách (5 % hm.), aby bolo možné zmysluplne získať tak kinetický, ako aj ustálený biokoncentračný faktor, okrem prípadov, keď možno tvrdiť, že testovaná látka sa neakumuluje primárne v lipidoch (napr. niektoré perfluórované látky sa môžu viazať na proteíny). Rovnice a príklady týchto výpočtov sú uvedené v dodatku 5.

Na účely opravy hodnoty kinetického BCF tak, aby zohľadňovala znižovanie koncentrácie látky vplyvom rastu, by sa podobne mala opraviť aj rýchlostná konštanta depurácie. Hodnota rýchlostnej konštanty depurácie opravená o rast (k_{2g}) sa vypočíta odpočítaním hodnoty rýchlostnej konštanty rastu (k_g, získanej z nameraných údajov o hmotnosti) od celkovej hodnoty rýchlostnej konštanty depurácie (k_2). Následne sa vypočíta hodnota kinetického biokoncentračného faktora opravená o rast, a to vydelením hodnoty rýchlostnej konštanty vychytávania (k_1) hodnotou rýchlostnej konštanty depurácie opravenej o rast (k_{2g}) (pozri dodatok 5). Tento postup však neplatí vo všetkých prípadoch. Napríklad v prípade látok s veľmi pomalou depuráciou testovaných u rýchlorastúcich rýb môže byť

▼M7

vypočítaná hodnota k_{2g} príliš malá, takže chyba v dvoch rýchlostných konštantách použitých na jej výpočet sa stane kritickou a spôsobí, že v niektorých prípadoch môžu byť odhady k_g vyššie ako k_2. V alternatívnom postupe, ktorým sa dá vyhnúť potrebe opravovať hodnoty o znižovanie koncentrácie látky vplyvom rastu, sa používajú hmotnostné údaje o depurácii testovanej látky za každú rybu (celú rybu) namiesto bežných hmotnostných údajov o testovanej látke (koncentrácii) na jednotku hmotnosti ryby. To sa dá ľahko dosiahnuť, keďže v skúškach podľa tejto testovacej metódy by sa zaznamenané údaje o koncentrácii v tkanivách mali vzťahovať na individuálne hmotnosti rýb. Jednoduchý návod je uvedený v dodatku 5. Pripomíname, že hodnota k_2 by sa mala zaznamenávať aj vtedy, keď sa použije alternatívny postup.

Kinetický biokoncentračný faktor a ustálený biokoncentračný faktor by sa mali zaznamenávať aj vo vzťahu k štandardnému 5 % (hm.) obsahu lipidov v rybách, okrem prípadov, keď možno tvrdiť, že testovaná látka sa neakumuluje primárne v lipidoch. Údaje o koncentráciách v rybách alebo o BCF sa normalizujú podľa pomeru medzi 5 % a skutočným (individuálnym) priemerom obsahu lipidov (v % vlhkej hmotnosti) (pozri dodatok 5).

Ak boli chemické analýzy a analýzy obsahu lipidov vykonané na tej istej rybe, tak by sa na výpočet hodnoty BCF s normalizovanými lipidmi mali použiť normalizované individuálne údaje o lipidoch v rybách. Ako alternatíva sa v prípade podobného rastu kontrolných a exponovaných rýb môže na opravu o lipidy použiť iba obsah lipidov v rybách z kontrolnej skupiny (pozri bod 56). Metóda výpočtu hodnoty BCF s normalizovanými lipidmi je uvedená v dodatku 5.

Interpretácia výsledkov

V prípadoch, v ktorých sa koncentrácie testovaných roztokov pohybujú na úrovni blízkej detekčnému limitu analytickej metódy, treba interpretovať výsledky s veľkou opatrnosťou.

Priemerný rast v testovanej i kontrolnej skupine by sa v zásade nemali výrazne odlišovať, aby sa vylúčili toxické účinky. Rýchlostné konštanty rastu alebo rastové krivky v oboch skupinách by sa mali vhodným spôsobom porovnať ([1]).

Jasne vymedzené krivky vychytávania a depurácie svedčia o dobrej kvalite údajov o biokoncentrácii. V prípade rýchlostných konštánt by mal výsledok χ^2 testu dobrej zhody svedčiť o vhodnosti]*t. j.* o malom percente chýb v meraní (32)] bioakumulačného modelu, takže rýchlostné konštanty by sa dali považovať za spoľahlivé (pozri dodatok 5). Ak sa použije viac ako jedna testovaná koncentrácia, mali by byť odchýlky konštánt vychytávania/depurácie medzi testovanými koncentráciami menšie ako 20 % ([2]). Ak nie sú, môže to svedčiť o závislosti od koncentrácie. Významné rozdiely zistené v rýchlostných konštantách vychytávania/depurácie medzi dvoma použitými testovanými koncentráciami by sa mali zaznamenať a podľa možnosti vysvetliť. Hranica 95 % spoľahlivosti hodnôt BCF sa v prípade dobre navrhnutých štúdií dosahuje vo všeobecnosti ± 20 % vypočítanej hodnoty BCF.

Ak sa testujú dve alebo viaceré koncentrácie, na zistenie konzistentnosti výsledkov a prípadnej závislosti od koncentrácie sa použijú výsledky oboch,

([1]) Môže sa vykonať *t*-skúška rýchlostných konštánt rastu na porovnanie rozdielov rastu medzi kontrolnou a testovanou skupinou, alebo *F*-skúška v prípade analýzy rozptylu. V prípade potreby môže použitie *F*-skúšky alebo skúšky miery pravdepodobnosti pomôcť pri výbere vhodného modelu rastu (OECD, monografia 54 (32).

([2]) Tieto percentá naznačujú, že analytické metódy sú spoľahlivé a polčas je < 14 dní. Ak majú analytické metódy menšiu spoľahlivosť, alebo ak je polčas (podstatne) vyšší, budú aj tieto čísla vyššie.

▼M7

príp. všetkých koncentrácií. Ak je na účely zníženia počtu použitých zvierat a/alebo zdrojov testovaná iba jedna koncentrácia, malo by sa použitie jednej koncentrácie zdôvodniť.

Výsledná hodnota BCF_{SS} je neistá v prípade, že je hodnota BCF_K podstatne vyššia ako hodnota BCF_{SS}, keďže to môže svedčiť buď o nedosiahnutí ustáleného stavu, alebo o tom, že znižovanie koncentrácie látky vplyvom rastu a procesy vylučovania neboli zohľadnené. Ak je hodnota BCF_{SS} oveľa vyššia ako hodnota BCF_K, mali by sa výpočty rýchlostných konštánt vychytávania a depurácie skontrolovať a prehodnotiť. Iný postup dosadzovania hodnôt by mohol zlepšiť odhadovanú výslednú hodnotu BCF_K (pozri dodatok 5).

Skúšobný protokol

Okrem informácií o testovanej látke uvedených v bode 3 by skúšobný protokol mal obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

— údaje o identifikácii chemikálie napr. názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt pozorované a ak je to prakticky uskutočniteľné atď. (v prípade potreby aj vrátane obsahu organického uhlíka),

— v prípade mnohozložkových látok a UVCB (látok neznámeho alebo variabilného zloženia, produktov komplexných reakcií alebo biologických materiálov) pokiaľ možno opis chemickej identity jednotlivých zložiek a pri každej z nich aj jej percentuálny podiel z celkovej hmotnosti látky. Mal by sa stručne opísať spôsob, akým analytická metóda použitá v teste odráža meranie koncentrácie látky. Mali by sa opísať všetky analytické postupy vrátane správnosti metódy, jej detekčného a kvantifikačného limitu,

— v prípade označenia rádioaktívnym izotopom presnú polohu označeného atómu, resp. atómov a percento rádioaktivity z nečistôt,

— informácie o toxicite testovanej látky pre ryby (v ideálnom prípade pre testované druhy). Toxicita by sa mala zaznamenať aj ako hodnota akútnej 96-hodinovej LC_{50} a hodnoty NOAEC a LOAEC z chronických štúdií (t. j. test v ranom štádiu života alebo test celého životného cyklu, ak sú k dispozícii),

— podmienky skladovania testovanej chemikálie alebo testovanej látky a stabilita testovanej chemikálie alebo testovanej látky za daných podmienok skladovania, ak sú pred použitím skladované.

Testované druhy:

vedecký názov, kmeň, pôvod, akékoľvek predbežné ošetrenie, aklimatizácia, vek, pohlavie (v prípade potreby), rozsahy veľkostí (hmotnosti a dĺžky) atď.

Podmienky testu:

— typ použitého testu (napríklad prietokový alebo polostatický), regulárna štúdia alebo minimalizovaný model (vrátane dôvodov a vysvetlenia),

— typ a charakteristiky použitého osvetlenia a fotoperiódy, resp. fotoperiód,

— plán štúdie (napr. počet a veľkosť testovacích komôr, rýchlosť výmeny objemu vody, veľkosť násady, počet replikátov, počet rýb na replikát, počet testovaných koncentrácií, dĺžka vychytávacej a depuračnej fázy, frekvencia odberu vzoriek rýb a vody),

▼M7

— metóda prípravy zásobných roztokov a frekvencia ich výmeny (ak sa použije rozpúšťadlo, mala by sa uviesť jeho koncentrácia a vplyv na obsah organického uhlíka) alebo opis alternatívneho systému dávkovania,

— nominálne testované koncentrácie, priemery hodnôt nameraných v testovacích nádržiach a ich štandardné odchýlky a spôsob a frekvencia ich zaznamenávania,

— zdroj vody na riedenie, opis jej akejkoľvek predbežnej úpravy, všetky výsledky preukazujúce schopnosť testovaných rýb žiť vo vode, ako aj vlastnosti vody: pH, tvrdosť, teplota, koncentrácia rozpusteného kyslík, hladiny rezíduí chlóru (ak sa merali), celkový organický uhlík, suspendované látky, slanosť testovaného média (v prípade potreby) a všetky ďalšie merania,

— kvalita vody v testovacej nádrži, pH, tvrdosť, TOC, teplota a koncentrácia rozpusteného kyslíka, použité metódy a frekvencie meraní,

— podrobné informácie o režime kŕmenia napr. druh(-y) potravy, zdroj, zloženie (pokiaľ možno aspoň obsah lipidov a proteínov), zvolené kŕmne dávky, podávané množstvo a frekvencia kŕmenia,

— informácie o úprave vzoriek rýb a vody vrátane podrobností o príprave, skladovaní, extrakcii a analytických postupoch (a presnosti) v prípade testovanej látky a obsahu lipidov,

— metódy použité randomizáciu úpravy a rozdeľovania vzoriek rýb do testovacích nádob,

— dátum vloženia testovaných organizmov do testovaných roztokov a dĺžka testu,

— opis štúdií na zistenie rozsahu a ich výsledkov, ak sú k dispozícii.

Výsledky:

— výsledky všetkých predbežných štúdií, ktoré sa vykonali,

— úmrtnosť rýb v kontrolnej skupine a v skupine z každej expozičnej komory a všetky pozorované abnormality v správaní,

— informácie o všetkých pozorovaných nežiaducich účinkoch,

— úplný opis všetkých postupov použitých na chemickú analýzu vrátane detekčných a kvantifikačných limitov, odchýlok a výťažnosti,

— obsah lipidov v rybách, vrátane použitej metódy, a ak sa vypočíta, aj lipidový normalizačný faktor (L_n, t. j. faktor, ktorý vyjadruje výsledky vo vzťahu k 5 % obsahu lipidov v rybách),

— tabuľkové údaje o hmotnosti (a dĺžke) rýb spolu s chemickými koncentráciami za každú rybu (v prípade potreby aj s obsahom lipidov) z kontrolnej i exponovanej skupiny (napr. označením každej ryby vo vzorke jedinečným identifikátorom) a výpočty rýchlostnej konštanty, resp. konštánt rastu,

▼M7

— tabuľkové údaje o koncentráciách testovanej látky v rybách (C_f pre každú rybu zvlášť) a vo vode (C_w) (v prípade potreby aj s priemernými hodnotami za testovanú a kontrolnú skupinu, štandardnými odchýlkami a rozsahmi) za všetky časy odberu vzoriek (C_f vyjadrená v mg/kg vlhkej hmotnosti celej teba alebo jeho konkrétneho tkaniva napr. tukového a C_w v mg/l), hodnoty C_w pre série kontrol (oznámiť treba aj hodnoty pozadia),

— krivky (vrátane všetkých nameraných údajov) zobrazujúce (v prípade potreby sa môžu koncentrácie vyjadriť vo vzťahu k celému telu a obsah lipidov normalizovať k 5 % hmotnosti zvieraťa alebo jeho konkrétneho tkaniva):

  — rast, t. j. hmotnosť rýb v závislosti od času alebo prirodzený logaritmus transformácie hmotnosti v čase (vrátane výpočtu rýchlostnej konštanty rastu k_g),

  — vychytávanie a depurácia testovanej látky v rybách (na jednom grafe),

  — čas, za ktorý sa dosiahol ustálený stav (ak sa dosiahne),

  — prirodzený logaritmus transformácie koncentrácie v závislosti od času vychytávania (vrátane výpočtu rýchlostnej konštanty vychytávania k_1),

  — prirodzený logaritmus transformácie koncentrácie (koncentrácie ln) v závislosti od času depurácie (vrátane výpočtu rýchlostnej konštanty depurácie k_2) a

  — krivky vychytávacej a depuračnej fázy znázorňujúce údaje a spôsob ich dosadzovania,

— ak sa vizuálnou kontrolou grafu zistia zjavné anomálie, na účely odstránenia neopodstatnených údajov sa môže použiť štatisticky validovaný test na odľahlé hodnoty, pripojí sa zdokumentované odôvodnenie ich vynechania,

— ustálený biokoncentračný faktor (BCF_{SS}), ak sa dosiahne (takmer) ustálený stav,

— kinetický biokoncentračný faktor (BCF_K) a výpočet rýchlostných konštánt vychytávania a depurácie k_1 a k_2 spolu s odchýlkami k_2 (smernica a úsek), ak sa použije sekvenčné dosadzovanie hodnôt,

— hranica spoľahlivosti, štandardná odchýlka (ak existuje) a metódy analýzy výpočtu/údajov pre každý parameter každej koncentrácie použitej testovanej látky,

  — všetky informácie o metabolitoch testovanej látky označených rádioaktívnym izotopom a o ich akumulovaní,

  — rýchlostná konštanta, resp. konštanty rastu (vrátane 95 % intervalu(-ov) spoľahlivosti) a výpočet hodnôt rýchlostnej konštanty depurácie (k_{2g}), polčasu a BCF (BCF_{Kg}) opravených o rast,

  — čokoľvek nezvyčajné, čo sa počas testu pozorovalo, všetky odchýlky od týchto postupov a všetky iné významné informácie,

  — súhrnná tabuľka s príslušnými nameranými a vypočítanými údajmi:

▼M7

Rýchlostné konštanty vychytávania a depurácie látky a biokoncentračné faktory (BCF)	
k_g (rýchlostná konštanta rastu, deň$^{-1}$):	vložte hodnotu (95 % CI) (1)
k_1 (celková rýchlostná konštanta vychytávania, l/kg^{-1}/deň$^{-1}$):	vložte hodnotu (95 % CI) (1)
k_2 (celková rýchlostná konštanta depurácie, deň$^{-1}$):	vložte hodnotu (95 % CI) (1)
k_{2g} (celková rýchlostná konštanta depurácie opravená o rast, deň$^{-1}$):	vložte hodnotu (95 % CI) (1)
C_f (chemická koncentrácia v rybách pri ustálenom stave, mg/kg^{-1}):	vložte hodnotu ± SD (2)
C_w (chemická koncentrácia v rybách vo vode, mg/l^{-1}):	vložte hodnotu ± SD (2)
L_n (lipidový normalizačný faktor):	vložte hodnotu (3)
BCF_{SS} (ustálený BCF, l/kg^{-1})	vložte hodnotu ± SD (2)
BCF_{SSL} (ustálený BCF s normalizovanými lipidmi, l/kg^{-1}):	vložte hodnotu (3) ± SD (2)
BCF_K (kinetický BCF, l/kg^{-1})	vložte hodnotu (95 % CI) (1)
BCF_{Kg} (kinetický BCF opravený o rast, l/kg^{-1})	vložte hodnotu (95 % CI) (1)
$t_{1/2g}$ (polčas opravený o rast, deň):	vložte hodnotu (95 % CI) (1)
BCF_{KL} (kinetický BCF s normalizovanými lipidmi, l/kg^{-1}):	vložte hodnotu
BCF_{KLG} (kinetický BCF s normalizovanými lipidmi opravený o rast, l/kg^{-1}):	vložte hodnotu

(1) CI: interval spoľahlivosti (ak sa dá odhadnúť)
(2) SD: štandardná odchýlka (ak sa dá odhadnúť)

Výsledky, ktoré sa pri vývoji predbežnej testovacej metódy a navrhovaní pokusu zaznamenávajú ako „nezistené/nekvantifikované v rámci detekčného/kvantifikačného limitu“ by sa nemali uvádzať, pretože sa ako také nemôžu na výpočet rýchlostných konštánt použiť.

C.13 – II: **Minimalizovaná skúška expozície rýb vo vodnom prostredí**

ÚVOD

Z pribúdajúcich skúseností s vykonávaním a interpretáciou úplných testov, ktoré nadobudli tak regulačné orgány, ako aj laboratóriá vyplýva, že pri určovaní rýchlostných konštánt vychytávania a depurácie platí, až na niektoré výnimky, kinetika prvého rádu. Preto možno rýchlostné konštanty vychytávania a depurácie určiť s minimálnym počtom odberu vzoriek a pritom vypočítať hodnotu kinetického BCF.

Pôvodným zámerom preskúmania alternatívnych návrhov štúdií BCF bolo vymyslieť minimalizovaný test, ktorý by sa používal ako postupový test na vyvrátenie alebo potvrdenie odhadov hodnoty BCF vychádzajúcich z K_{OW} a kvantitatívneho vzťahu štruktúry a aktivity (QSAR), a tým eliminovať potrebu úplnej štúdie v prípade mnohých látok a minimalizovať náklady a používanie zvierat znížením počtu odberov vzoriek a sekvenčných analýz. Cieľom bolo na

▼M7

základe hlavného návrhu predchádzajúcej testovacej metódy umožniť prepojenie výsledkov testu s existujúcimi hodnotami BCF a uľahčiť vykonávanie testov a interpretáciu údajov, a tak získať odhady BCF, ktoré by boli dostatočne správne a presné na účely prijímania rozhodnutí o hodnotení rizík. Aj v tomto prípade platia mnohé z pravidiel uplatňovaných pri úplnom teste, napr. validačné kritériá (pozri bod 24) a zastavenie testu na konci vychytávacej fázy, ak je pozorované nedostatočné vychytávanie (pozri body 16 a 38).

Látky, ktoré by boli vhodné na použitie pri minimalizovanom teste, by mali patriť do všeobecnej skupiny, pre ktorú bola táto testovacia metóda vyvinutá, t. j. nepolárne organické látky (pozri bod 49). Ak existuje akýkoľvek náznak, že sa látka, ktorá sa má testovať, môže správať inak (napr. zjavne sa odchýliť od kinetiky prvého rádu), mal by sa na účely regulácie vykonať úplný test.

Minimalizovaná skúška obyčajne netrvá kratšie ako štandardný BCF test, nevyžaduje si však toľko odberov vzoriek (vysvetlenie je uvedené v dodatku 6). Depuračná fáza sa však v prípade rýchle sa vylučujúcich látok môže skrátiť, aby sa zabránilo koncentráciám v rybách, ktoré pred koncom testu nedosiahnu detekčný/kvantifikačný limit. Na základe minimalizovaného testu expozície rýb s jednou koncentráciou možno zistiť potrebu uskutočniť úplný test a v prípade, že sú výsledné údaje použité na výpočet rýchlostných konštánt a hodnoty BCF spoľahlivé (pozri bod 93), nemusí sa vykonať úplný test, ak výsledná hodnota BCF ani zďaleka nedosahuje predpísané rizikové hodnoty.

V niektorých prípadoch môže byť výhodné použiť návrh minimalizovanej skúšky s viac ako jednou testovanou koncentráciou ako predbežný test na zistenie, či sú odhady hodnôt BCF pre danú látku závislé od koncentrácie. Ak odhady hodnôt BCF z minimalizovanej skúšky vykazujú závislosť od koncentrácie, bude potrebné vykonať úplný test. Ak na základe takejto minimalizovanej skúšky nie sú odhady hodnôt BCF závislé od koncentrácie, no výsledky sa nepovažujú za konečné, potom by sa každý nasledujúci úplný test mohol vykonať s jednou koncentráciou, čím by sa znížil počet použitých zvierat v porovnaní s úplným testom s dvomi (alebo viacerými) koncentráciami.

Látky, ktoré by boli vhodné na použitie pri minimalizovanej skúške, by mali:

— potenciálne vykazovať kinetiku vychytávania a depurácie blížiacu sa kinetike prvého rádu, napr. na základe údajov o podobných látkach nadobudnutých krížovým prístupom (tzv. read-across),

— mať hodnotu log K_{OW} < 6, okrem prípadov, keď sa očakáva rýchly metabolizmus ([1]),

— byť dostatočne rozpustné vo vode s ohľadom na použitú analytickú techniku (pozri bod 24),

— byť jasne merateľné (*t. j.* koncentrácie by mali byť vyššie ako ich kvantifikačný limit) tak v rybách, ako aj vo vode, pričom sa odporúča označovanie rádioaktívnymi izotopmi (pozri bod 23) a

— mať dlhší čas depurácie ako je ich odhadovaný polčas (výpočty sú uvedené v dodatku 5), príp. by sa trvanie depurácie malo primerane upraviť (pozri bod 91). Výnimka z tohto pravidla je povolená, ak sa očakáva rýchly metabolizmus látky.

([1]) Minimalizovaná skúška sa v skutočnosti môže použiť aj na preukázanie rýchleho metabolizmu, ak je známe, že rýchly metabolizmus môže byť pravdepodobný.

▼M7

HARMONOGRAM ODBERU VZORIEK PRI ŠTÚDIÁCH S NÁVRHOM MINIMALIZOVANEJ SKÚŠKY

Odber vzoriek rýb

Odber vzoriek rýb je zredukovaný na štyri miesta odberu vzoriek:

— uprostred a na konci vychytávacej fázy (odber na konci znamená zároveň začiatok depurácie), napr. po 14 a 28 dňoch (33).

— Uprostred depuračnej fázy a na konci štúdie (keď koncentrácia látky dosiahne hodnotu < 10 % maximálnej koncentrácie alebo aspoň došlo k zjavnému prekročeniu polčasu látky), napr. po 7 a 14 dňoch depurácie (33). Ak sa očakáva alebo preukáže rýchla depurácia, môže byť potrebné skrátiť dĺžku depuračnej fázy, aby sa zabránilo koncentráciám v rybách, ktoré nedosiahnu kvantifikačný limit,

— lipidy sa merajú ako pri úplnom teste,

— oprava o rast sa vykoná ako pri úplnom teste.

— Hodnota BCF sa vypočíta ako hodnota kinetického BCF.

Odber vzoriek vody

Pri minimalizovanom návrhu testu sa vzorky odoberajú ako pri úplnom teste (pozri bod 54) alebo aspoň v piatich intervaloch rovnomerne rozdelených počas vychytávacej fázy a týždenne počas depuračnej fázy.

Úpravy návrhu testu

Po zohľadnení vlastností testovanej látky, platných prognóz QSAR a špecifického účelu štúdie je možné zvážiť niekoľko úprav návrhu testu:

— ak sa vyžaduje vyššia presnosť, môže sa vo vzorke na konci vychytávacej fázy použiť viac rýb (6 alebo 8 namiesto 4).

— Môže sa pridať skupina rýb navyše, ak depurácia na 14. deň (alebo na predpokladanom konci depuračnej fázy) nestačí na dosiahnutie primeranej depurácie (*t. j.* > 50 %). Ak je predpokladaná dĺžka depuračnej fázy kratšia alebo dlhšia ako 14 dní, mal by sa prispôsobiť harmonogram odberu vzoriek (t. j. jedna skupina rýb na predpokladanom konci depuračnej fázy a jedna skupina po uplynutí polčasu).

— Môžu sa použiť dve testované koncentrácie s cieľom preskúmať možnú závislosť od koncentrácie. Ak výsledky minimalizovanej skúšky vykonanej s dvomi testovanými koncentráciami preukazujú, že hodnota BCF nie je závislá od koncentrácie (t. j. odlišuje sa o menej ako 20 %), môže na úplnú skúšku, ak sa vykoná, stačiť jedna testovaná koncentrácia.

— Môže byť pravdepodobné, že modely bioakumulačných procesov, napr. také, ktoré navrhuje Arnot *et al.* (35), možno použiť ako pomôcku pri plánovaní dĺžky vychytávacej a depuračnej fázy (pozri aj dodatok 5).

Výpočty

Podstatou použitia tohto prístupu je, že biokoncentračný faktor možno v úplnom teste stanoviť buď ako ustálený biokoncentračný faktor (BCF_{SS}), a to výpočtom pomeru koncentrácie testovanej látky v rybom tkanive ku koncentrácii testovanej látky vo vode, alebo ako výpočet hodnoty kinetického biokoncentračného faktora (BCF_K) z pomeru rýchlostnej konštanty vychytávania k_1 k rýchlostnej konštante depurácie k_2. Hodnota BCF_K je platná aj vtedy, ak sa počas vychytávacej fázy nedosiahne ustálená koncentrácia látky, a to za predpokladu, že sa vychytávanie a depurácia riadia približne procesmi kinetiky prvého rádu. Ako absolútne

▼M7

minimum sa na odhad rýchlostných konštánt vychytávania a depurácie vyžadujú dva odbery vzoriek – jeden na konci vychytávacej fázy (*t. j.* na začiatku depuračnej fázy) a jeden na konci (alebo po dostatočne dlhom trvaní) depuračnej fázy. Na kontrolu kinetiky vychytávania a depurácie sa odporúča uprostred spomínaných dvoch odberov urobiť ešte jeden odber ([1]). Výpočty sú uvedené v dodatkoch 5 a 6.

Interpretácia výsledkov

Ak chcete posúdiť platnosť a informačnú hodnotu testu, presvedčte sa, že depuračná fáza presiahla jeden polčas. Okrem toho by sa mala porovnať hodnota BCF_{Km} (kinetický BCF vypočítaný pri minimalizovanom teste) s minimalizovanou hodnotou BCF_{SS} (ide o hodnotu BCF_{SS} vypočítanú na konci vychytávacej fázy za predpokladu dosiahnutia ustáleného stavu. Ide len o predpoklad, pretože počet odberov vzoriek nestačí na jeho potvrdenie). Ak je hodnota BCF_{Km} < minimalizovaná hodnota BCF_{SS}, preferovanou hodnotu by mala byť minimalizovaná hodnota BCF_{SS}. Ak je hodnota BCF_{Km} menšia ako 70 % minimalizovanej hodnoty BCF_{SS}, výsledky nie sú platné a mal by sa vykonať úplný test.

Ak je hodnota BCF_{Km} dosiahnutá minimalizovanou skúškou blízko ktorejkoľvek rizikových hodnôt z hľadiska regulácie, mal by sa vykonať úplný test. Ak je výsledok ďaleko od ktorejkoľvek z predpísaných rizikových hodnôt (ďaleko vyšší alebo nižší), úplný test nemusí byť potrebný, príp. sa môže vykonať úplný test s jednou koncentráciou, ak sa to vyžaduje v príslušnom regulačnom rámci.

Ak sa po minimalizovanej skúške s jednou koncentráciou zistí, že treba vykonať úplný test, môže sa vykonať s druhou koncentráciou. Ak sú výsledky konzistentné, nemusí sa ďalej vykonať úplný test s odlišnou koncentráciou, pretože sa neočakáva závislosť biokoncentrácie látky od koncentrácie. Ak sa vykonala minimalizovaná skúška s dvomi koncentráciami a jej výsledky nepreukážu závislosť od koncentrácie, celá skúška sa môže vykonať iba s jednou koncentráciou (pozri bod 87).

Skúšobný protokol

Skúšobný protokol k minimalizovanej skúške by mal obsahovať všetky informácie požadované v prípade úplného testu (pozri bod 81), okrem tých, ktoré nie je možné spracovať (*t. j.* krivka závislosti času na dosiahnutie ustáleného stavu od ustáleného biokoncentračného faktoru; namiesto ustáleného biokoncentračného faktoru by sa mala uviesť minimalizovaná hodnota BCF_{SS}). Okrem toho by mal obsahovať aj odôvodnenie použitia minimalizovanej skúšky a výslednú hodnotu BCF_{Km}.

C.13 – III: **Test biokoncentrácie u rýb s expozíciou z potravy**

ÚVOD

Metóda opísaná v tomto oddiele by sa mala používať v prípade látok, ktoré nie sú vhodné pre metódu expozície vo vodnom prostredí (napr. preto, že nie je možné udržať stabilné, merateľné koncentrácie vo vode alebo dosiahnuť primerané celkové zaťaženie organizmu za 60 dní expozície; pozri predchádzajúce oddiely o metóde expozície vo vodnom prostredí). Treba si však uvedomiť, že konečným parametrom bude pri tejto skúške potravový biomagnifikačný faktor (BMF) a nie biokoncentračný faktor (BCF) ([2]).

V máji 2001 bola na konferencii SETAC Europe v Madride predstavená nová metóda testovania bioakumulácie v prípade slabo rozpustných organických látok (36). Táto práca vychádza z rôznych štúdií bioakumulácie publikovaných v odbornej literatúre a využíva metódu dávkovania potravy obohatenej o testovanú látku (*napr.* 37). Začiatkom roka 2004 bol pracovnej skupine EÚ PBT

([1]) Ak sa meria iba pri dvoch odberoch, môžu sa odhady hranice spoľahlivosti hodnoty BCF_{Km} dosiahnuť použitím metód opakovaných výberov (bootstrap). Ak sú dostupné aj údaje z odberu uprostred, hranice spoľahlivosti hodnoty BCF_{Km} sa môžu vypočítať tak ako v úplnom teste.

([2]) Definície a jednotky sú uvedené v dodatku 1.

▼M7

spolu s podpornými dokumentmi (39) predložený návrh protokolu (38) merania bioakumulačného potenciálu slabo rozpustných organických látok, ktoré nie sú vhodné pre štandardnú metódu vodnej expozície. Ďalším argumentom v prospech tejto metódy bolo, že k možnej expozícii životného prostredia účinkom týchto slabo rozpustných látok (*t. j.* s hodnotou log K_{OW} > 5) dochádza prevažne z potravy [pozri (40) (41) (42) (43) (44)]. Preto sa v niektorých predpisoch týkajúcich sa chemikálií uvádzajú aj skúšky expozície z potravy ([1]). Treba si však uvedomiť, že v rámci tu opísanej metódy je potrebné dôsledne sa vyhýbať expozícii vo vodnej fáze, preto hodnotu BMF z tejto testovacej metódy nemožno priamo porovnať s hodnotou BMF zo skúšok v teréne (kde je možné kombinovať expozíciu vo vodnom prostredí s expozíciou z potravy).

Tento oddiel opisovanej testovacej metódy vychádza zo spomínaného protokolu (38) a je novou metódou, ktorá v predchádzajúcej verzii testovacej metódy C.13 nebola uvedená. Tento alternatívny test umožňuje priamo v kontrolovaných laboratórnych podmienkach preskúmať dráhu expozície z potravy.

Potenciálni výskumní pracovníci by si mali naštudovať body 1 až 14 tejto testovacej metódy, aby získali informácie o tom, kedy je možné uprednostniť skúšku expozície z potravy pred skúškou expozície vo vodnom prostredí. K dispozícii sú aj informácie o rôznych koncentráciách látok, ktoré by sa mali zvážiť pred vykonaním testu.

Použitie látok označených rádioaktívnymi izotopmi možno zvážiť podobne ako pri metóde expozície vo vodnom prostredí (pozri body 6 a 65).

Metóda expozície z potravy sa môže použiť na testovanie viac ako jednej látky iba jedným testom, ak sú splnené určité kritériá; tie sú podrobnejšie rozobraté v bode 112. Pre zjednodušenie sa metodika, ktorá je tu opísaná, týka iba testu s jednou testovanou látkou.

Skúška expozície z potravy sa v mnohých aspektoch podobá metóde expozície vo vodnom prostredí, s výnimkou zjavného rozdielu v dráhe expozície. Preto sa mnohé aspekty metódy, ktorá je tu opísaná, prekrývajú s metódou expozície vo vodnom prostredí opísanou v predchádzajúcom oddiele. Podľa možnosti sú uvádzané krížové odkazy na príslušné body v predchádzajúcom oddiele, no v záujme prehľadnosti a zrozumiteľnosti nebolo možné sa do istej miery vyhnúť duplicite.

PRINCÍP TESTU

Je možné použiť prietokové alebo polostatické podmienky (pozri odsek 4); prietokové podmienky sa odporúčajú na obmedzenie potenciálnej expozície testovanej látky z vody z dôvodu akejkoľvek desorpcie z obohatenej potravy alebo výkalov. Test pozostáva z dvoch fáz: vychytávacej (krmivo obohatené o testovanú látku) a depuračnej (čisté, neupravené krmivo) (pozri bod 16). Počas vychytávacej fázy sa „testovanej“ skupine rýb denne podáva presne určená dávka komerčného krmiva so známym zložením, ktoré je obohatené o testovanú látku. V ideálnom stave zožerú ryby všetku podávanú potravu (pozri bod 141). V priebehu depuračnej fázy sa potom ryby kŕmia čistým, neupraveným komerčným krmivom pre ryby. Pokiaľ ide o metódu expozície vo vodnom prostredí, môže

([1]) Na účely nariadenia (ES) č. 1907/2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemikálií (REACH) (Ú. v. EÚ L 396, 30.12.2006, s. 1) je táto otázka predmetom dokumentu „Usmernenie k informačným požiadavkám a posudzovaniu chemickej bezpečnosti“, kapitola R.7c, R.7.10.3.1, s. 13; kapitola R.7.10.4.1, s. 31-32 a obrázok R7.10-2, s. 50.

▼M7

sa v prípade potreby použiť viac ako jedna testovaná skupina s viacerými koncentráciami obohatenými o testovanú látku, ale pre väčšinu vysoko hydrofóbnych organických látok stačí jedna testovaná skupina (pozri body 49 a 107). Ak sa použijú polostatické podmienky, mali by sa ryby na konci vychytávacej fázy premiestniť do nového média a/alebo novej testovacej komory (pre prípad, že médium a/alebo testovacie zariadenia používané vo fáze vychytávania boli kontaminované testovanou látkou vyplavovaním). Počas oboch fáz testu sa merajú koncentrácie testovanej látky v rybách. Okrem skupiny rýb, ktorým sa podáva obohatené krmivo (testovaná skupina), je v podobných podmienkach držaná aj kontrolná skupina rýb, ktorá sa kŕmi rovnakým spôsobom, ale bez obohatenia komerčného krmiva pre ryby testovanou látkou. Táto kontrolná skupina umožňuje kvantifikovať pozaďové úrovne testovanej látky v neexponovaných rybách a slúži ako porovnanie akýchkoľvek nežiaducich účinkov vyvolaných pridaním testovanej látky v testovanej skupine, resp. skupinách ([1]). Zároveň umožňuje porovnať rýchlostné konštanty rastu medzi skupinami ako kontrola, či boli skonzumované rovnaké množstvá podanej potravy (pri vysvetľovaní rozdielov v rýchlostných konštantách rastu by sa mali zvážiť aj rozdiely v chuti jednotlivých druhov krmív; pozri bod 138). Tak vo vychytávacej, ako aj depuračnej fáze je dôležité, aby sa testovaná a kontrolná skupina kŕmili potravou vyváženej výživovej hodnoty.

Podľa navrhovateľov metódy je vychytávacia fáza v trvaní 7 až 14 dní vo všeobecnosti postačujúca (38) (39). Takéto trvanie by malo minimalizovať náklady na vykonanie testu, a pritom stále zaručovať dostatočnú expozíciu pri väčšine látok. V niektorých prípadoch je však možné vychytávaciu fázu predĺžiť (pozri bod 127). Počas vychytávacej fázy nemusí koncentrácia látky v rybách dosiahnuť ustálený stav, preto spracovanie údajov a výsledky z tejto metódy obyčajne vychádzajú z kinetickej analýzy rezíduí v tkanivách. [Poznámka: Aj v tomto prípade možno použiť rovnice pre odhad času do dosiahnutia ustáleného stavu ako v skúške expozície vo vodnom prostredí – pozri dodatok 5). Depuračná fáza začína vo chvíli, keď sú ryby po prvýkrát kŕmené neobohatenou potravou a zvyčajne trvá maximálne 28 dní alebo do chvíle, kým už nie je možné testovanú látku kvantifikovať v celej rybe, podľa toho, čo nastane skôr. Depuračná fáza môže byť kratšia, ale aj dlhšia ako 28 dní, podľa toho, ako sa časom menia merané chemické koncentrácie a veľkosť rýb.

Touto metódou sa v prípade testovanej látky v rybách môže stanoviť polčas špecifický pre danú látku ($t_{1/2}$, z rýchlostnej konštanty depurácie k_2), asimilačná účinnosť (absorpcia v črevách, a), kinetický potravový biomagnifikačný faktor (BMF_K), kinetický potravový biomagnifikačný faktor opravený o rast (BMF_{Kg}) a kinetický potravový biomagnifikačný faktor opravený o lipidy (BMF_{KL}) ([2]) (a/alebo kinetický potravový biomagnifikačný faktor opravený o rast a lipidy, BMF_{KgL}). Tak ako v prípade metódy expozície vo vodnom prostredí, dôjde nárastom hmotnosti rýb počas skúšky k zriedeniu testovanej látky v rastúcich rybách, a tým aj k podhodnoteniu (kinetického) BMF, ak sa jeho hodnota neupraví o rast (pozri body 162 a 163). Navyše, ak sa zistí, že ustálený stav sa dosiahol vo vychytávacej fáze, je možné vypočítať orientačnú hodnotu ustáleného BMF. K dispozícii sú postupy, ktoré umožňujú odhad kinetického biokoncentračného faktora (BCF_K) z údajov získaných zo skúšky expozície z potravy (napr. (44) (45) (46) (47) (48). Výhody a nevýhody takýchto prístupov sú opísané v dodatku 8.

([1]) Pri väčšine testovaných látok by v ideálnom prípade mala byť voda s kontrolnou skupinou bez nálezov. Pozaďové koncentrácie by mali byť relevantné iba v prípade prirodzene zastúpených materiálov (napr. niektorých kovov) a látok, ktoré sú v životnom prostredí všadeprítomné.

([2]) Keďže BMF je definovaný ako pomer medzi koncentráciou látky v organizme k ustálenej koncentrácii látky obsiahnutej v potrave podávanej organizmu, a to pri zohľadnení lipidov opravou hodnoty BMF o obsah lipidov v organizme a v potrave, tento postup sa preto presnejšie označuje ako „oprava“. Ide o iný postup ako „normalizácia“ stanoveného obsahu lipidov v organizme, ktorá platí pre test biokoncentrácie s expozíciou vo vodnom prostredí.

▼M7

Táto skúška bola primárne navrhnutá pre slabo rozpustné nepolárne organické látky, ktorých vychytávanie a depurácia v rybách sa približne riadi procesmi kinetiky prvého rádu. V prípade testovanej látky, pri ktorej sa vychytávanie a depurácia neriadia približne procesmi kinetiky prvého rádu, by sa mali použiť komplexnejšie modely (pozri odkazy v dodatku 5) a poradiť sa s bioštatistikom a/alebo s farmakokinetikom.

Hodnota BMF sa obyčajne stanovuje analýzou testovanej látky v celých rybách (na báze vlhkej hmotnosti). Ak je to relevantné pre dosiahnutie cieľa štúdie, môžu sa vzorky odoberať aj z istých konkrétnych tkanív (napríklad svalov, pečene) v prípade, že sa ryby rozdelia na jedlé a nejedlé časti (pozri bod 21). Okrem toho je možné odstrániť a samostatne analyzovať gastrointestinálny trakt, aby sa zistil jeho podiel na koncentráciách v celej rybe pri odberoch vzoriek na konci vychytávacej a tesne pred začiatkom depuračnej fázy, alebo ako súčasť prístupu založeného na rovnováhe hmotnosti.

Obsah lipidov v celých rybách zo vzorky sa meria tak, aby sa koncentrácie mohli opraviť o lipidy, pričom sa berie do úvahy obsah lipidov v krmive i rybách (pozri body 56 a 57 a dodatok 7).

Hmotnosť jednotlivých rýb vo vzorke by sa mala merať a zaznamenať a dať do súvislosti s koncentráciou analyzovanej chemikálie v danej rybe (napr. zaznamenaním jedinečného identifikačného kódu každej ryby zo vzorky), aby sa mohol vypočítať rast, ktorý je možné dosiahnuť počas skúšky. Ak je to možné, mala by sa zmerať aj celková dĺžka rýb ([1]). Údaje o hmotnosti sú potrebné aj na určenie hodnoty BCF použitím údajov z depuračnej fázy získaných počas skúšky expozície z potravy.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

K dispozícii by mali byť informácie o testovanej látke opísané v bodoch 3 a 22. Analytická metóda pre koncentrácie testovanej látky vo vode obyčajne nie je potrebná; povinné sú metódy vhodnej citlivosti na meranie koncentrácií v potrave a tkanivách rýb.

Táto metóda sa môže použiť na testovanie viac ako jednej látky iba jedným testom. Testované látky by však mali byť navzájom kompatibilné tak, aby nereagovali a nemenili svoju chemickú identitu po ich pridaní do potravy pre ryby. Cieľom je, aby sa výsledky namerané pri každej testovanej látke príliš nelíšili od výsledkov, ktoré by sa dosiahli individuálnym testom pri každej z testovaných látok. Predbežnou analýzou by sa malo zabezpečiť, aby bolo možné každú látku opätovne získať zo vzorky viacnásobne obohatenej potravy a rybieho tkaniva, a to i) s vysokou výťažnosťou (napr. > 85 % nominálnej hodnoty) a ii) s citlivosťou zodpovedajúcou potrebám testovania. Celková dávka všetkých testovaných látok by nemala presiahnuť kombinovanú koncentráciu, ktorá by mohla vyvolať toxické účinky (pozri bod 51). Pri návrhu skúšky by sa navyše mali vziať do úvahy možné nepriaznivé účinky vyvolané u rýb, ako aj účinky vyplývajúce z možnej interakcie (napr. metabolické účinky), ktoré sú spojené s testovaním viacerých látok súčasne. Testovanie ionizovateľných látok súčasne sa neodporúča. Pokiaľ ide o expozície, táto metóda je vhodná aj pre komplexné zmesi (pozri bod 13, hoci pre analýze platia rovnaké obmedzenia, ako pri akejkoľvek inej metóde).

PLATNOSŤ TESTU

Ak má byť test platný, musia platiť tieto podmienky (pozri bod 24):

— odchýlky teploty vody sú menšie ako ± 2 °C tak pri testovanej, ako aj kontrolnej skupine,

([1]) Celková dĺžka by sa mala počas skúšky zaznamenávať aj preto, že je dobrým ukazovateľom výskytu nežiaduceho účinku.

▼M7

— koncentrácia rozpusteného kyslíka nesmie klesnúť pod 60 % hodnoty saturácie vzduchu,

— koncentrácia testovanej látky v potrave pre ryby pred vychytávacou fázou a na jej konci je v rozmedzí ± 20 % (podľa minimálne troch vzoriek z oboch časov odberu),

— vysoký stupeň homogénnosti látky v krmive by sa mal preukázať predbežnou analýzou obohatenej potravy, minimálne tri vzorky koncentrácie látky odobraté na začiatku skúšky by sa nemali líšiť viac ako o ± 15 % priemeru,

— v neobohatenej potrave ani v tkanivách rýb z kontrolnej skupiny neboli zistené koncentrácie testovanej látky, alebo sú zastúpené iba v bežných stopových množstvách,

— úmrtnosť alebo iné nepriaznivé účinky/choroby u rýb z testovanej a kontrolnej skupiny sú na konci testu ≤ 10 %, ak sa test z nejakého dôvodu predĺži, nepriaznivé účinky v oboch skupinách sú ≤ 5 % za mesiac a spolu ≤ 30 %. Výrazné rozdiely v priemernom raste medzi testovanými a kontrolnými skupinami rýb zo vzorky by mohli byť signálom toxického účinku testovanej látky.

REFERENČNÉ LÁTKY

Ak laboratórium predtým túto skúšku nevykonávalo alebo nastali podstatné zmeny (napr. zmena kmeňa rýb alebo ich dodávateľa, iný druh rýb, markantné rozdiely v ich veľkosti, zmeny v potrave pre ryby a v metóde jej obohacovania), odporúča sa vykonať štúdiu technickej spôsobilosti použitím referenčnej látky. Referenčná látka sa používa primárne na zistenie primeranosti spôsobu obohacovania krmiva v záujme maximálnej homogenity a biodostupnosti testovaných látok. Príkladom, ktorý sa použil v prípade nepolárnych hydrofóbnych látok, je hexachlórbenzén (HCB), ale vzhľadom na nebezpečnosť HCB ([1]) by sa mali zvážiť aj iné látky, pri ktorých existujú spoľahlivé údaje o vychytávaní a biomagnifikácii. Ak sa použije referenčná látka, mali by sa v skúšobnom protokole uviesť základné informácie o nej vrátane názvu, čistoty, čísla CAS, štruktúry, údajov o toxicite (ak sú dostupné) tak, ako v prípade testovanej látky (pozri body 3 a 22).

OPIS METÓDY

Prístrojové vybavenie

Mali by sa používať rovnaké materiály a prístrojové vybavenie ako v prípade skúšky expozície vo vodnom prostredí (bod 26). Mal by sa použiť prietokový alebo statický testovací systém s obnovovaním média a s dostatočným objemom vody na riedenie do testovacích nádrží. Prietokové rýchlosti by sa mali zaznamenať.

Voda

Mala by sa používať rovnaká testovacia voda ako v prípade skúšky expozície vo vodnom prostredí (body 27 až 29). V opise testovacieho média by sa mali uvádzať jeho vlastnosti, pričom počas testu by jeho kvalita mala byť konštantná. Obsah prirodzených tuhých častíc a celkového organického uhlíka by mal byť pred začiatkom testu čo najmenší (≤ 5 mg/l častíc, ≤ 2 mg/l celkového organicky viazaného uhlíka). TOC je potrebné merať iba pred skúškou v rámci opisu vlastností testovacej vody (pozri bod 53).

([1]) HCB je uvedený v prílohách A a C k Štokholmskému dohovoru a v prílohách I a III k nariadeniu (ES) č. 850/2004 o perzistentných organických znečisťujúcich látkach (Ú. v. EÚ L 158, 30.4.2004, s. 7).

▼M7

Krmivo

Odporúča sa komerčne dostupná potrava pre ryby (plávajúce a/alebo pomaly klesajúce krmivo v tvare peliet), ktorá obsahuje minimálne bielkoviny a tuky. Potrava by mala mať jednotnú veľkosť peliet, aby sa zvýšila účinnosť expozície z potravy, t. j. aby ryby zjedli väčšie množstvo potravy namiesto toho, aby sa zamerali na väčšie kusy potravy a menšie kusy nechali nepovšimnuté. Veľkosť peliet by mala adekvátne zodpovedať veľkosti rýb na začiatku testu (napr. sa môžu použiť pelety s priemerom okolo 0,6 – 0,85 mm pre ryby s celkovou dĺžkou od 3 do 7 cm a 0,85 – 1,2 mm pre ryby s celkovou dĺžkou od 6 do 12 cm). Veľkosť peliet možno upraviť v závislosti od rastu rýb na začiatku depuračnej fázy. Príklad vhodného zloženia komerčne dostupnej potravy je uvedený v dodatku 7. Pri navrhovaní tejto metódy sa bežne používal test krmív s celkovým obsahom lipidov medzi 15 a 20 % (hm.). V niektorých oblastiach nemusí byť dostupná potrava pre ryby s takou vysokou koncentráciou lipidov. V takýchto prípadoch je možné realizovať štúdie s nižšou koncentráciou lipidov v potrave a v prípade potreby vhodne upraviť kŕmne dávky tak, aby ryby zostali zdravé (na základe výsledkov predbežného testovania). Celkový obsah lipidov v krmive pre testovanú a kontrolnú skupinu je potrebné pred začiatkom skúšky a na konci vychytávacej fázy zmerať a zaznamenať. V skúšobnom protokole by sa mali uviesť údaje poskytnuté dodávateľmi komerčných krmív o ich analýze zameranej na živiny, vlhkosť, vlákninu, popol, a ak je to možné, aj na minerálne látky a rezíduá pesticídov (napr. „bežné“ prioritné znečisťujúce látky).

Ak sa potrava obohacuje testovanou látkou, treba sa za každú cenu snažiť o zaručenie jej homogénnosti v celom množstve testovanej potravy. Koncentrácia testovanej látky v potrave určenej pre testovanú skupinu by sa mala zvoliť s ohľadom na citlivosť analytickej techniky, toxicitu testovanej látky (NOEC, ak je známa), ako aj na príslušné fyzikálno-chemické údaje. Ak sa použije referenčná látka, odporúča sa pridať ju pri koncentrácii okolo 10 % koncentrácie testovanej látky (v každom prípade však pri takej nízkej, akú je možné dosiahnuť) na základe analýzy citlivosti (napr. v prípade hexachlórbenzénu obsiahnutého v potrave je akceptovateľná koncentrácia 1 – 100 µg/g; viac informácií o asimilačnej účinnosti HCB sa uvádza v bode 47).

Testovanou látkou možno potravu pre ryby obohacovať niekoľkými spôsobmi v závislosti od fyzikálnych vlastností a rozpustnosti (podrobnosti o metódach obohacovania sú uvedené v dodatku 7):

— ak je látka rozpustná a stabilná v triglyceridoch, mala by sa pred pridaním do rybieho krmiva rozpustiť v malom množstve rybieho oleja alebo jedlého rastlinného oleja. V takom prípade treba dbať na to, aby výsledná dávka nebola príliš bohatá na lipidy z hľadiska prirodzeného obsahu lipidov obohateného krmiva pripočítaním minimálneho známeho množstva oleja potrebného na dosiahnutie správnej distribúcie a homogénnosti testovanej látky v potrave, alebo

— potrava by mala byť obohatená použitím vhodného organického rozpúšťadla, pokiaľ sa tým neohrozí homogénnosť a biodostupnosť [je možné, že sa v dôsledku vyparovania rozpúšťadla v potrave vytvoria (mikro)kryštály testovanej látky, ktorých výskyt nie je jednoduché dokázať, pozri (49)], alebo

— neviskózne kvapaliny by sa mali pridávať priamo do potravy pre ryby, ale mali by sa dobre premiešať, aby sa dosiahla homogénnosť a uľahčila vhodná asimilácia. Spôsob miešania by mal zaručovať homogénnosť obohateného krmiva.

▼M7

V niektorých prípadoch, napr. pri menej hydrofóbnych testovaných látkach s väčšou pravdepodobnosťou desorpcie z potravy, môže byť potrebné ponoriť pripravené pelety do malého množstva kukuričného/rybieho oleja (pozri bod 142). V takýchto prípadoch by sa malo podobne postupovať aj v prípade potravy pre kontrolnú skupinu a na účely merania lipidov by sa malo použiť hotové pripravené krmivo.

Ak sa použije referenčná látka, mali by byť jej výsledky porovnateľné s údajmi zo štúdií publikovaných v odbornej literatúre, ktoré boli vykonané za podobných podmienok a s porovnateľnou kŕmnou dávkou (pozri bod 45), pričom parametre špecifické pre referenčnú látku by mali spĺňať príslušné kritériá uvedené v bode 113 (odseky 3, 4 a 5).

Ak sa ako nosič testovanej látky použije olej alebo nosné rozpúšťadlo, malo by sa rovnaké množstvo toho istého nosiča (bez testovanej látky) zmiešať aj s krmivom pre kontrolnú skupinu, aby sa zachovala rovnocennosť s obohatenou potravou. Je dôležité, aby sa tak vo vychytávacej, ako aj depuračnej fáze testovaná a kontrolná skupina kŕmili potravou rovnocennej výživovej hodnoty.

Obohatená potrava by sa mala skladovať v podmienkach, v ktorých sa zachová stabilita testovanej látky v kŕmnej zmesi (napr. chladením) a tieto podmienky uviesť v skúšobnom protokole.

Výber druhov rýb

Môžu sa použiť rovnaké druhy rýb ako pri skúške expozície vo vodnom prostredí (pozri bod 32 a dodatok 3). Pred uverejnením tejto testovacej metódy sa v štúdiách potravovej bioakumulácie s organickými látkami bežne používa pstruh dúhový (*Oncorhynchus mykiss*), kapor rybničný (*Cyprinus carpio*) a čerebľa potočná (*Pimephales promelas*). Testované druhy by sa pri kŕmení mali správať tak, aby sa dosiahla rýchla konzumácia podanej kŕmnej dávky, čím sa zabezpečí minimalizácia akýchkoľvek faktorov ovplyvňujúcich koncentráciu testovanej látky v potrave (napr. vyplavovanie do vody a možnosť expozície vo vodnom prostredí). Mali by sa použiť ryby v odporúčanom rozpätí veľkosti/hmotnosti (pozri dodatok 3). Ryby by nemali byť príliš malé na to, aby sa dali ľahko individuálne analyzovať. Testované druhy s rýchlym rastom v priebehu životného cyklu môžu komplikovať interpretáciu údajov, a vysoká rýchlosť rastu zase môže ovplyvniť výpočet asimilačnej účinnosti ([1]).

Chov rýb

Kritériá prijateľnosti v prípade aklimatizácie, úmrtnosti a ochorení sú rovnaké ako pri skúške expozície vo vodnom prostredí pred vykonaním testu (pozri body 33 až 35).

VYKONANIE TESTU

Činnosti pred uskutočnením štúdie na vyhľadávanie rozsahu

Analytické prípravné práce pred štúdiou sú potrebné, aby sa preukázal výťažok látky z obohatenej potravy/obohateného rybieho tkaniva. Test na vyhľadávanie rozsahu na výber vhodných koncentrácií v potrave nie je vždy nevyhnutný. Aby sa preukázalo, že nie sú pozorované žiadne nepriaznivé účinky, ako aj na posúdenie chute obohatenej potravy, citlivosti metódy analýzy tkaniva rýb a potravy a výberu vhodnej kŕmnej dávky intervalov odberu vzoriek v depuračnej fáze

([1]) Z dôvodu rýchleho rastu vo vychytávacej fáze bude skutočná kŕmna dávka nižšia ako tá na začiatku testu.

▼M7

atď., možno vykonať predbežné pokusy s kŕmením, ktoré však nie sú povinné. Predbežná štúdia môže byť užitočná na odhad počtu rýb potrebných na odber vzoriek počas depuračnej fázy. To by mohlo mať za následok podstatné zníženie počtu použitých rýb, najmä v prípade testovaných látok, ktoré sú mimoriadne vnímavé na metabolizmus.

Podmienky expozície

Dĺžka vychytávacej fázy

Vychytávacia fáza v trvaní 7 až 14 dní obyčajne postačuje a počas nej sa denne kŕmi jedna skupina rýb kontrolným krmivom a druhá skupina testovaným krmivom fixnými dávkami stanovenými v závislosti od testovaných druhov zvierat a experimentálnych podmienok, napr. 1 až 2 % telesnej hmotnosti (vlhkej) v prípade pstruha dúhového. Kŕmne dávky treba zvoliť tak, aby sa zabránilo rýchlemu rastu a prílišnému zvýšeniu obsahu lipidov. V prípade potreby možno vychytávaciu fázu predĺžiť na základe praktických skúseností z predchádzajúcich štúdií alebo poznaniu vychytávania/depurácie testovanej (alebo analogickej) látky v rybách. Začiatok skúšky sa definuje ako čas prvého kŕmenia obohatenou potravou. Deň experimentu trvá od chvíle kŕmenia do chvíle krátko pred uplynutím času ďalšieho kŕmenia (napr. jedna hodina). Preto prvý experimentálny deň vychytávania trvá od okamihu prvého kŕmenia obohatenou potravou a končí krátko pred druhým kŕmením obohatenou potravou. V praxi to znamená, že sa vychytávacia fáza skončí krátko pred (napr. jedna hodina) prvým kŕmením potravou neobohatenou o testovanú látku, keďže ryby budú aj v najbližších 24 hodinách stále tráviť obohatenú potravu a absorbovať testovanú látku. Je dôležité zabezpečiť dosiahnutie primerane veľkého (netoxického) celkového zaťaženia organizmu testovanou látkou podľa potrieb analytickej metódy tak, aby bolo v depuračnej fáze možné merať aspoň o rádovo nižší pokles zaťaženia. V osobitných prípadoch predĺženej fázy vychytávania (až na 28 dní) sa môže použiť dodatočný odber vzoriek v snahe získať podrobné informácie o kinetike vychytávania. Počas vychytávania nemusí koncentrácia v rybách dosiahnuť ustálený stav. Podobne ako pri skúške expozície vo vodnom prostredí možno aj tu použiť rovnice na odhad času do dosiahnutia ustáleného stavu, ktoré slúžia ako ukazovateľ pravdepodobného trvania potrebného na dosiahnutie hodnotiteľných koncentrácií rýb (pozri dodatok 5).

V niektorých prípadoch je možné, že buď v dôsledku slabej analytickej citlivosti, alebo nízkej asimilačnej účinnosti nebude vychytávanie látky rybami v trvaní 7 až 14 dní stačiť na to, aby použitá koncentrácia v potrave dosiahla takú vysokú koncentráciu v rybách, pri ktorej je možné analyzovať aspoň o rádovo nižší pokles vo fáze depurácie. V takých prípadoch môže byť vhodné predĺžiť počiatočnú fázu kŕmenia na dlhšie ako 14 dní, alebo, zvlášť v prípade vysoko metabolizovateľných látok, zvážiť vyššiu koncentráciu v potrave. Treba však dbať na to, aby celkové zaťaženie organizmu počas vychytávacej fázy zostalo pod úrovňou (odhadovanej) chronickej koncentrácie bez pozorovaného účinku (NOEC) v rybích tkanivách (pozri bod 138).

Dĺžka depuračnej fázy

Depurácia obyčajne trvá maximálne 28 dní od začiatku kŕmenia testovanej skupiny rýb čistou, neupravenou potravou po skončení fázy vychytávania. Depurácia začína prvým kŕmením „neobohatenou“ potravou a nie hneď po poslednom podaní „obohatenej“ potravy, keďže ryby budú aj v najbližších 24 hodinách stále tráviť potravu a absorbovať testovanú látku, ako sa uvádza v bode126. Preto sa prvá vzorka v depuračnej fáze odoberie krátko pred druhým kŕmením neobohatenou potravou. Depuračná fáza je navrhnutá tak, aby zachytila látky s možným polčasom do 14 dní, čo zodpovedá bioakumulatívnym látkam ([1]), takže 28 dní

([1]) V skúške expozície vo vodnom prostredí by 14 dňový polčas zodpovedal hodnote BCF okolo 10 000 l/kg u rýb s hmotnosťou 1 g pri rýchlosti vychytávania 500 l/kg za deň [podľa rovnice publikovanej Sijm *a kol.* (46)].

▼M7

znamená dva polčasy týchto látok. V prípadoch látok s veľmi vysokou bioakumuláciou môže byť vhodné depuračnú fázu predĺžiť (ak tak ukáže predbežné testovanie).

Ak sa látka vylučuje veľmi pomaly, takže nie je možné presne určiť polčas v depuračnej fáze, môžu tieto informácie aj naďalej stačiť na účely zistenia vysokého stupňa bioakumulácie. Naopak, ak je látka vylučovaná tak rýchlo, že nie je možné spoľahlivo odvodiť koncentráciu v čase nula (koncentrácia na konci vychytávacej/začiatku depuračnej fázy $C_{0,d}$) ani hodnotu k_2, možno urobiť konzervatívny odhad hodnoty k_2 (pozri dodatok 7).

Ak z analýzy rýb v skorších intervaloch (napr. 7 alebo 14 dní) vyplýva, že sa látka pred uplynutím celého 28 dňového obdobia vylučuje pod úrovňou kvantifikácie, tak sa každý ďalší odber vzoriek preruší a skúška sa ukončí.

V niektorých prípadoch nemusí na konci vychytávacej fázy (alebo s druhou depuračnou vzorkou) dôjsť k žiadnemu merateľnému vychytávaniu testovanej látky. Ak možno preukázať, že: i) kritériá platnosti v bode 113 sú splnené a ii) nulové vychytávanie nie je spôsobené iným nedostatkom pri skúške (napr. nedostatočne dlhá fáza vychytávania, nedostatky v spôsobe obohacovania potravy spôsobujúce slabú biodostupnosť, nedostatočná citlivosť analytickej metódy, ryby odmietajúce žrať potravu atď.), je možné štúdiu ukončiť bez toho, aby sa musela zopakovať s dlhšou vychytávacou fázou. Ak sa počas prípravy skúšky ukázalo, že môže nastať tento prípad, odporúča sa pokiaľ možno vykonať analýzu výkalov na nestrávenú testovanú látku ako súčasť prístupu založeného na rovnováhe hmotnosti.

Počty testovaných rýb

Podobne ako pri skúške expozície vo vodnom prostredí by sa mali vybrať ryby s podobnou hmotnosťou a dĺžkou, pričom najmenšie ryby by nemali vážiť menej ako dve tretiny hmotnosti najväčších (pozri body 40 až 42).

Celkový počet rýb použitých v štúdii by sa mal vyberať podľa harmonogramu odberu vzoriek (minimálne jedna vzorka na konci vychytávacej fázy a štyri až šesť vzoriek počas depuračnej fázy v závislosti od dĺžok jednotlivých fáz), pričom sa zohľadňuje citlivosť analytickej techniky, pravdepodobná koncentrácia, ktorá sa dosiahne na konci vychytávacej fázy (na základe predchádzajúcich skúseností) a počas depurácie (ak je na základe predchádzajúcich skúseností možné urobiť odhad). V každom čase odberu vzoriek by sa malo odobrať päť až desať rýb a pred chemickou analýzou, príp. analýzou obsahu lipidov by sa mali odmerať parametre rastu (hmotnosť a celková dĺžka).

Vzhľadom na prirodzenú odlišnosť veľkostí, mieru rastu, fyziológiu rýb, ako aj možné rozdiely v množstve podanej potravy, ktorú každá ryba skonzumuje, by sa pri každom odbere vzoriek malo odobrať aspoň päť rýb z testovanej a päť z kontrolnej skupiny, aby bolo možné adekvátne stanoviť priemernú koncentráciu a jej odchýlky. Rozdiely medzi použitými rybami môžu počas skúšky prispievať k výsledným nekontrolovaným odchýlkam viac ako prirodzené odchýlky v použitých analytických metódach, a preto sa v niektorých prípadoch môže použiť až 10 rýb na každú odobranú vzorku. Ak však nie je na začiatku depuračnej fázy možné zmerať pozaďové koncentrácie testovanej látky v rybách z kontrolnej skupiny, môže chemická analýza dvoch až troch „kontrolných“ rýb pri poslednom odbere vzoriek kontroly postačovať iba vtedy, ak sa zvyšok rýb z kontrolnej skupiny pri každom z časov odberu vzoriek naďalej odoberá na účely zisťovania hmotnosti a celkovej dĺžky (aby bol odobraný rovnaký počet vzoriek z testovanej i kontrolnej skupiny na rast). Ryby by sa mali uskladniť, jednotlivo odvážiť (aj keď sa ukáže, že výsledky zo vzorky sa budú musieť následne skombinovať) a odmerať, aby sa zistila ich celková dĺžka.

▼M7

Pri štandardnej skúške napr. s 28 dňovou depuračnou fázou vrátane piatich odberov vzoriek počas depurácie by to malo predstavovať celkom 59 až 120 rýb z testovanej a 50 až 110 z kontrolnej skupiny za predpokladu, že daná metóda analýzy látky umožňuje vykonať analýzu obsahu lipidov na tej istej rybe. Ak nie je možné vykonať analýzu obsahu lipidov na tej istej rybe, na ktorej sa vykonala chemická analýza, a na analýzu obsahu lipidov nie je možné použiť ani ryby z kontrolnej skupiny (pozri bod 56), bude potrebné odobrať ďalších 15 rýb (tri zo zásobnej populácie na začiatku skúšky, po tri z kontrolnej i testovanej skupiny na začiatku depurácie a po tri z kontrolnej a testovanej skupiny na konci pokusu). Príklad harmonogramu odberu vzoriek s počtom rýb sa uvádza v dodatku 4.

Násada

Podobne ako v prípade skúšky expozície vo vodnom prostredí (body 43 a 44) by sa mal použiť podobne vysoký pomer vody k množstvu rýb. Hoci veľkosť násady z hľadiska pomeru vody k množstvu rýb nemá v tejto skúške vplyv na expozičné koncentrácie, obyčajne sa odporúča veľkosť násady v rozmedzí od 0,1 do 1,0 g rýb (vlhká hmotnosť) na liter vody denne, aby sa zachovali primerané koncentrácie rozpusteného kyslíka a minimalizovalo vystavenie testovaných organizmov stresu.

Testovacie krmivo a kŕmenie

Počas obdobia aklimatizácie by sa ryby mali kŕmiť primeranou potravou tak, ako je opísané v bode 117. Ak sa skúška vykonáva v prietokových podmienkach, prietok by sa mal v čase kŕmenia rýb prerušiť.

Počas skúšky by potrava pre skúšobnú skupinu mala zodpovedať podmienkam opísaným v bodoch 116 až 121. Okrem špecifických faktorov látky by sa chuť potravy mala zohľadňovať aj pri určovaní analytickej citlivosti, očakávanej koncentrácia v potrave v environmentálnych podmienkach a úrovní chronickej toxicity/celkového zaťaženia organizmu a výbere cieľovej koncentrácie obohacovania (aby ryby krmivo neodmietali). Nominálne koncentrácie obohacovania testovanou látkou by sa mali uviesť do protokolu. Na základe skúseností poskytujú koncentrácie obohacovania v rozsahu 1 – 1 000 μg/g dostatočne praktické pracovné rozpätie pri testovaných látkach, ktoré nevykazujú špecifický toxický mechanizmus. V prípade látok s nešpecifikovaným mechanizmom by hladiny rezíduí v tkanivách nemali prekročiť 5 μ/g lipidov, pretože rezíduá prekračujúce túto úroveň môžu vyvolať chronické účinky (19) (48) (50) ([1]). Pri ostatných látkach treba dbať na to, aby nenastali žiadne nepriaznivé účinky z akumulovanej expozície (pozri bod 127). Platí to najmä v prípade, ak sa testuje viac ako jedna látka súčasne (pozri bod 112).

Potrava pre ryby sa môže obohatiť o vhodné množstvo testovanej látky jedným z troch spôsobov opísaných v bode 119 a v dodatku 7. Metódy a postup obohacovania krmiva by mali byť zdokumentované v protokole. Ryby z kontrolnej vzorky sa kŕmia neupravenou potravou, ktorá obsahuje rovnaké množstvo neobohateného olejového nosiča, ak sa použil na obohatenie potravy vo fáze vychytávania, alebo potravou upravenou „čistým“ rozpúšťadlom, ak sa na prípravu potravy pre testovanú skupinu použil nosič s rozpúšťadlom. Upravená a neupravená potrava by sa mala merať analyticky najmenej trikrát na koncentráciu testovanej látky pred začiatkom a na konci vychytávacej fázy. Po expozícii účinkom upraveného krmiva (fáza vychytávania) sa ryby (z obidvoch skupín) kŕmia neupravenou potravou (fáza depurácie).

Ryby sa kŕmia fixnou kŕmnou dávkou (v závislosti od druhu, napr. približne 1 – 2 % vlhkej telesnej hmotnosti na deň v prípade pstruha dúhového). Kŕmne dávky treba zvoliť tak, aby sa zabránilo rýchlemu rastu a prílišnému zvýšeniu obsahu lipidov. Presná kŕmna dávka stanovená počas pokusu by sa mala zaznamenať. Počiatočné kŕmenia by malo byť založené na pravidelných meraniach hmotnosti

([1]) Keďže skutočné vnútorné koncentrácie možno určiť až po vykonaní skúšky, je potrebné urobiť odhad očakávanej vnútornej koncentrácie (napr. na základe očakávanej hodnoty BMF a koncentrácie v potrave, pozri rovnicu A5.8 v dodatku 5).

▼M7

rýb zo zásobnej populácie tesne pred začiatkom skúšky. Množstvo krmiva by sa malo upraviť podľa vlhkých hmotností rýb vo vzorke pri každom odbere vzoriek, aby sa zohľadnil rast počas pokusu. Hmotnosti a dĺžky rýb v testovacích a kontrolných nádržiach možno odhadnúť z hmotností a celkových dĺžok rýb použitých pri každom odbere vzoriek; neváţte a nemerajte ryby, ktoré zostanú v testovacích a kontrolných nádržiach. V priebehu experimentu je dôležité zachovať rovnakú stanovenú dávku krmiva.

Kŕmenie by sa malo pozorovať, aby sa zabezpečilo, že ryby viditeľne skonzumujú všetku ponúknutú potravu, čím sa zaručí, že na výpočty sa použijú vhodné miery príjmu potravy. Pri stanovovaní kŕmnej dávky by sa mali zohľadniť pokusy s predbežným kŕmením, príp. predchádzajúce skúsenosti, aby sa zaručilo, že sa skonzumuje všetka potrava z kŕmenia raz denne. Ak ryby potravu dlhodobo nekonzumujú, odporúča sa dávku rozdeliť a časť podať v rámci jedného kŕmenia navyše, ktoré sa pridá na každý experimentálny deň (napr. kŕmenie raz denne sa nahradí kŕmením dvakrát denne s polovičným množstvom krmiva). Ak je to potrebné, malo by sa druhýkrát kŕmiť v pevne stanovenom čase a tak, aby pred odberom vzoriek uplynulo čo najviac času (napr. čas druhého kŕmenia sa stanoví na prvú polovicu experimentálneho dňa).

Hoci vo všeobecnosti konzumujú ryby potravu rýchlo, je dôležité zaručiť, že látka bude aj naďalej absorbovaná v potrave. Treba sa snažiť vyhnúť tomu, aby sa testovaná látka v potrave rozptýlila vo vode, čo by spôsobilo expozíciu rýb koncentráciám testovanej látky z vodného prostredia a nie z potravy. To možno dosiahnuť odstránením neskonzumovanej potravy (aj výkalov) z testovacích a kontrolných nádrží do jednej hodiny po kŕmení, najlepšie však do 30 minút. Okrem toho je možné použiť systém, ktorým je voda neustále čistená aktívnym uhlíkovým filtrom, aby sa z nej absorbovali všetky „rozpustené“ kontaminanty. Rýchlemu odplaveniu častíc potravy a rozpustených látok môžu pomôcť prietokové systémy ([1]). V niektorých prípadoch je možné tento problém odstrániť aj miernou úpravou spôsobu obohacovania potravy (pozri bod 119).

Svetlo a teplota

Podobne ako pri skúške expozície vo vodnom prostredí (pozri bod 48) sa 12 až 16 hodinová fotoperióda a teplota (± 2 °C) odporúčajú ako vhodné podmienky pre použité testované druhy (pozri dodatok 3). Typ osvetlenia a jeho charakteristiky musia byť známe a zapísané do protokolu.

Kontroly

Mala by sa použiť jedna kontrolná skupina, v ktorej sú ryby kŕmené rovnakou kŕmnou dávkou ako v testovanej skupine, ale bez prítomnosti testovanej látky v krmive. Ak sa na obohatenie potravy pre testovanú skupinu použije olejový nosič alebo nosič s rozpúšťadlom, mal by sa rovnakým spôsobom upraviť aj potrava pre kontrolnú skupinu, ale bez prítomnosti testovanej látky, aby bola potrava pre testovanú i kontrolnú skupinu rovnaká (pozri body 121 a 139).

([1]) Prítomnosť testovanej látky v testovacom médiu v dôsledku jej vylučovania rybami alebo vyplavovaním z potravy nie je možné úplne vylúčiť. Jednou z možností je preto merať koncentráciu látky vo vode na konci vychytávacej fázy, najmä ak sa použije polostatický systém, aby sa zistilo, či nedošlo k expozícii vo vodnom prostredí.

▼M7

Frekvencia meraní kvality vody

Aj tu platia podmienky opísané v skúške s expozíciou vo vodnom prostredí, s výnimkou toho, že TOC sa musí merať iba pred skúškou ako súčasť určovania vlastností testovanej vody (pozri bod 53).

Odber a analýza vzoriek rýb a potravy

Analýza vzoriek potravy

Vzorky potravy pre testovanú i kontrolnú skupinu by sa mali analyzovať najmenej trikrát na prítomnosť testovanej látky a obsah lipidov, a to minimálne pred začiatkom a na konci vychytávacej fázy. Analytické metódy a postupy na zabezpečenie homogénnosti krmiva by mali byť uvedené v protokole.

Vzorky by sa mali na prítomnosť testovanej látky analyzovať stanovenou a platnou metódou. Prípravné práce pred štúdiou sú potrebné na stanovenie kvantifikačného limitu, percenta výťažku, interferencií a analytických odchýlok v zamýšľanej matrici odberu vzoriek. Ak sa testuje materiál označený rádioaktívnym izotopom, mali by sa zohľadňovať rovnaké skutočnosti ako v prípade skúšky expozície vo vodnom prostredí, akurát namiesto analýzy vody sa vykoná analýza potravy (pozri bod 65).

Analýza rýb

Pri každom odbere vzoriek rýb sa odoberie 5 až 10 rýb z exponovanej a kontrolnej skupiny (v niektorých prípadoch je možné počet rýb z kontrolnej skupiny znížiť, pozri bod 134).

Odber vzoriek by mal prebiehať každý experimentálny deň v rovnakom čase (podľa času kŕmenia) a mal by sa načasovať tak, aby sa minimalizovala pravdepodobnosť pretrvávania potravy v črevách v priebehu trvania vychytávacej fázy a na začiatku depuračnej fázy, a tým sa zabránilo falošným prírastkom k celkovým koncentráciám testovanej látky (*t. j.* ryby vo vzorke by sa mali na konci experimentálneho dňa vybrať, pričom treba pamätať na to, že experimentálny deň začína časom kŕmenia a končí časom ďalšieho kŕmenia, čiže asi o 24 hodín neskôr. Depurácia začína prvým kŕmením neobohatenou potravou, pozri bod 128). Prvá vzorka z depuračnej fázy (odobraná krátko pred druhým kŕmením neobohatenou potravou) je dôležitá, pretože extrapolácia údajov z tohto bodu merania v predchádzajúcom dni slúži na odhad koncentrácie v čase nula ($C_{0,d}$ je koncentrácia v rybách na konci vychytávacej/začiatku depuračnej fázy). Nepovinne sa môže na konci vychytávacej a na 1. a 3. deň depurácie odstrániť a samostatne analyzovať gastrointestinálny trakt rýb.

Pri každom odbere vzoriek by sa mali ryby z oboch testovacích nádrží vybrať a malo by sa s nimi zaobchádzať rovnako, ako v prípade skúšky expozície vo vodnom prostredí (pozri body 61 až 63).

Koncentrácie testovanej látky v celých rybách (vlhká hmotnosť) sa merajú aspoň na konci vychytávacej a v priebehu depuračnej fázy tak v kontrolných, ako aj pokusných skupinách. Počas depuračnej fázy sa odporúča urobiť štyri až šesť odberov (napr. 1, 3, 7, 14 a 28 dní). Nepovinne sa po 1 – 3 dňoch vychytávania, t. j. stále blízko začiatku expozičného času, môže pridať ďalší odber vzoriek, aby sa určila asimilačná účinnosť z lineárnej fázy vychytávania. Možné sú dve hlavné odchýlky od harmonogramu: i) ak sa na účely prieskumu kinetiky vychytávania predĺži vychytávacia fáza, budú sa počas nej robiť ďalšie odbery vzoriek, takže bude potrebné pridať ďalšie ryby (pozri bod 126); ii) ak sa štúdia na konci vychytávacej fázy ukončí z dôvodu vychytávania, ktoré sa nedá merať (pozri bod 131). Každá jedna ryba odobraná do vzorky sa odváži (a zmeria sa jej celková dĺžka), aby sa mohli určiť rýchlostné konštanty rastu. Koncentrácie

▼M7

látky v špecifických tkanivách rýb (jedlých i nejedlých častiach) možno tiež merať na konci vychytávacej fázy a vo vybraných časoch počas depurácie. Ak sa testuje materiál označený rádioaktívnym izotopom, mali by sa zohľadňovať rovnaké skutočnosti ako v prípade skúšky expozície vo vodnom prostredí, akurát namiesto analýzy vody sa vykoná analýza potravy (pozri bod 65).

V prípade pravidelného používania referenčnej látky (pozri bod 25) je vhodnejšie, aby sa koncentrácie merali v testovanej skupine na konci vychytávacej fázy a v každom čase depurácie stanovenom pre danú testovanú látku (na celých rybách); koncentrácie sa musia analyzovať iba v kontrolnej skupine na konci vychytávania (na celých rybách). Za určitých okolností (napr. ak metódy analýzy testovanej a referenčnej látky nie sú kompatibilné, takže na dodržanie harmonogramu odberu vzoriek budú potrebné ďalšie ryby) možno použiť aj iný postup (opísaný ďalej), ako minimalizovať potrebu pridania ďalších rýb. Koncentrácie referenčnej látky sa počas depuračnej fázy merajú iba v 1. a 3. deň a v ďalších dvoch časoch odberu vzoriek vybraných tak, aby bolo možné urobiť spoľahlivé odhady koncentrácie v čase nula ($C_{0,d}$) a k_2 pre referenčnú látku.

Ak je to možné, mal by sa stanoviť obsah lipidov v jednotlivých rybách pri každom odbere vzoriek, alebo aspoň na začiatku a na konci vychytávacej a na konci depuračnej fázy. (pozri body 56 a 67). V závislosti od použitej analytickej metódy (pozri bod 67 a dodatok 4) možno použiť tie isté ryby tak na analýzu obsahu lipidov, ako aj určovanie koncentrácie testovanej látky. Táto možnosť sa uprednostňuje v snahe minimalizovať počet rýb. Ak by to však nebolo možné, môže sa použiť rovnaký postup ako pri skúške expozície vo vodnom prostredí (pozri bod 56 pre alternatívne možnosti merania lipidov). Metóda použitá na kvantifikáciu obsahu lipidov by mala byť zdokumentovaná v protokole.

Kvalita analytickej metódy

Mali by sa vykonávať experimentálne kontroly, aby sa zaručila špecifickosť, správnosť, presnosť a reprodukovateľnosť analytickej techniky špecifickej pre danú látku, ako aj výťažnosť testovanej látky z potravy a rýb.

Meranie rastu rýb

Na začiatku testu sa musí odvážiť vzorka rýb zo zásobnej populácie (a zmerať ich celková dĺžka). Tieto ryby by mali byť odobrané do vzorky tesne (t. j. jednu hodinu) pred prvým kŕmením obohatenou potravou a zaradené do experimentálneho dňa 0. Počet rýb z tejto vzorky by mal byť minimálne rovnaký ako vo vzorkách počas skúšky. Niektoré z nich môžu byť tie isté ryby, ktoré sa použili na analýzu obsahu lipidov pred začiatkom vychytávacej fázy (pozri bod 153). Pri každom odbere vzoriek sa ryby najskôr odvážia a zmerajú. Pri každej jednej rybe by sa nameraná hmotnosť a dĺžka mala dať do súvislosti s koncentráciou analyzovanej chemikálie (a v prípade potreby aj s obsahom lipidov) napr. označením každej ryby zo vzorky jedinečným identifikátorom. Merania na týchto vzorkách rýb možno použiť na odhad hmotnosti (a dĺžky) rýb, ktoré zostanú v testovacích a kontrolných nádržiach.

Experimentálne hodnotenie

Prípady mortality by sa mali denne sledovať a zaznamenávať. Sledovať a zaznamenávať by sa mali aj iné nepriaznivé účinky napr. nezvyčajné správanie alebo pigmentácia. Ryby sa považujú za uhynuté, ak nemožno pozorovať žiaden respiračný pohyb ani reakciu na slabý mechanický podnet. Všetky uhynuté alebo zjavne hynúce ryby by sa mali odstrániť.

▼M7

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Spracovanie výsledkov

Výsledky skúšky sa používajú na určenie rýchlostnej konštanty depurácie (k_2) ako funkcie celkovej vlhkej hmotnosti rýb. Konštanta rýchlosti rastu k_g vychádzajúca z priemeru prírastkov hmotnosti rýb sa v prípade potreby počíta a používa na získanie rýchlostnej konštanty vychytávania k_{2g} opravenej vzhľadom na rast. Okrem toho by sa do protokolu mala zapísať aj asimilačná účinnosť (a, absorpcia z čriev), kinetický biomagnifikačný faktor (BMF_K) (ak je to potrebné, opravený vzhľadom na rast – BMF_{Kg}), jeho hodnota opravená vzhľadom na obsah lipidov (BMF_{KL} alebo BMF_{KgL}, ak je opravená aj vzhľadom na rast) a kŕmna dávka. Ak je možné urobiť odhad času na dosiahnutie ustáleného stavu vo vychytávacej fáze (napr. 95 % ustáleného stavu alebo $t_{95} = 3{,}0/k_2$), možno pridať aj odhad hodnoty BMF v ustálenom stave (BMF_{SS}) (pozri body 105 a 106 a dodatok 5), ak hodnota t_{95} naznačuje, že sa môžu dosiahnuť podmienky ustáleného stavu. Hodnota BMF_{SS} by sa mala opraviť vzhľadom na obsah lipidov tak isto ako hodnota kinetického BMF (BMF_K), aby bolo možné získať jeho hodnotu opravenú vzhľadom na obsah lipidov – BMF_{SSL} (upozorňujeme, že neexistuje žiaden schválený postup na opravu ustáleného BMF vzhľadom na rast). Vzorce a príklad výpočtu sú uvedené v dodatku 7. K dispozícii sú postupy, ktoré umožňujú odhad kinetického biokoncentračného faktora (BCF_K) z údajov získaných zo skúšky expozície z potravy. Tieto sú opísané v dodatku 8.

Údaje o hmotnosti/dĺžke rýb

Do tabuľky sa zvlášť pre testovanú a kontrolnú skupinu zapíšu vlhké hmotnosti a dĺžky jednotlivých rýb v každom časovom intervale a za všetky dni odberu vzoriek vo vychytávacej fáze (zásobná populácia na začiatku vychytávania, kontrolná a testovaná skupina na konci vychytávacej fázy a v prípade, že sa uskutoční, tak aj v jej počiatočnej fáze (napr. v 1. až 3. deň vychytávania), ako aj počas depuračnej fázy (napr. dni 1, 2, 4, 7, 14, 28 v kontrolnej i testovanej skupine). Hmotnosť je preferovaným parametrom rastu na účely opravy vzhľadom na znižovanie koncentrácie látky vplyvom rastu. Metóda, resp. metódy používané na opravu údajov vzhľadom na rast sú uvedené v bodoch 162 a 163 a v dodatku 5.

Údaje o koncentrácii testovanej látky v rybách

Merania rezíduí testovanej látky v jednotlivých rybách (alebo v združených vzorkách rýb, ak jednotlivé merania nie sú možné) vyjadrené ako koncentrácia vo vlhkej hmotnosti (v hm. %) sa zapíšu do tabuľky pre testovanú a kontrolnú skupinu rýb pri každom jednom odbere vzoriek. Ak sa každá vzorka rýb podrobila analýze obsahu lipidov, potom je možné odvodiť a zapísať do tabuľky aj jednotlivé koncentrácie opravené vzhľadom na obsah lipidov vyjadrené ako koncentrácia lipidov (v hm. %).

— Merania rezíduí testovanej látky v jednotlivých rybách (alebo v združených vzorkách rýb, ak jednotlivé merania nie sú možné, pozri bod 66) počas depuračnej fázy sa prevedú na ich prirodzené logaritmy a zakreslia do grafu v závislosti od času (dňa). Ak sa vizuálnou kontrolou grafu zistia zjavné odľahlé hodnoty, môže sa použiť štatisticky platná skúška na odľahlé hodnoty, ktorou sa odstránia falošné údaje, a pridať odôvodnenie ich vynechania.

— Vypočíta sa lineárna zhoda najmenších štvorcov z údajov pre ln (koncentrácia) vo vzťahu k depurácii (deň). Smernica a úsek priamky sa zaznamenajú do protokolu ako celková hodnota rýchlostnej konštanty depurácie (k_2) a prirodzený logaritmus odvodenej hodnoty koncentrácie v čase nula ($C_{0,d}$) (podrobnosti sú uvedené v dodatku 5 a dodatku 7). Ak by to nebolo možné z dôvodu nižších koncentrácií ako ich kvantifikačný limit v druhej vzorke z depuračnej fázy, môže sa urobiť konzervatívny odhad hodnoty k_2 (pozri dodatok 7).

— Vypočítajú sa odchýlky od smernice a úseku priamky použitím štandardných štatistických metód a 90 % (alebo 95 %) intervaly spoľahlivosti týchto výsledkov sa vyhodnotia a zapíšu.

▼M7

— Vypočíta sa aj priemerná hodnota koncentrácie nameranej v posledný deň vychytávania (koncentrácia nameraná v čase nula $C_{0,m}$) a porovná sa s odvodenou hodnotu $C_{0,d}$. Ak je odvodená hodnota nižšia ako nameraná, ich rozdiel môže svedčiť o prítomnosti nestrávenej obohatenej potravy v črevách. Ak je odvodená hodnota oveľa vyššia ako nameraná, možno sa domnievať, že hodnota odvodená z lineárnej regresie depuračných údajov nie je správna a mala by sa prehodnotiť (pozri dodatok 7).

Rýchlosť depurácie a biomagnifikačný faktor

Na výpočet biomagnifikačného faktora z existujúcich údajov by sa najskôr mala získať hodnota asimilačnej účinnosti (absorpcie testovanej látky v črevách α). Na tento účel by sa mala použiť rovnica A7.1 uvedená v dodatku 7, pri ktorej treba poznať odvodenú hodnotu koncentrácie v čase nula depuračnej fázy ($C_{0,d}$), (celkovú) hodnotu rýchlostnej konštanty depurácie (k_2), hodnotu koncentrácie v potrave (C_{food}), rýchlostnú konštantu trávenia potravy (I) a dĺžku vychytávacej fázy (t). Zaznamená sa smernica a úsek lineárneho vzťahu medzi ln (koncentráciou) a časom depurácie ako celková hodnota rýchlostnej konštanty depurácie (k_2= smernica) a koncentrácie v čase nula ($C_{0,d} = e^{úsek}$), ako je opísané vyššie. Mala by sa skontrolovať biologická plauzibilita odvodených hodnôt (napr. asimilačná účinnosť ako zlomok nie je väčšia ako 1). Hodnota (I) sa vypočíta každý deň vydelením hmotnosti potravy hmotnosťou kŕmených rýb (ak sú kŕmené množstvom zodpovedajúcim 2 % telesnej hmotnosti, hodnota (I) bude 0,02). Hodnotu kŕmnej dávky použitú vo výpočte možno bude treba upraviť tak, aby zodpovedala rastu rýb (možno tak urobiť použitím známej rýchlostnej konštanty rastu na odhad hmotnosti rýb pri každom odbere vzoriek počas vychytávacej fázy, pozri dodatok 7). Ak nie je možné hodnoty k_2 a $C_{0,d}$ odvodiť, napr. z dôvodu koncentrácií pod limitom detekcie v druhej vzorke z depuračnej fázy, možno urobiť konzervatívny odhad hodnoty k_2 a „hornej hranice“ hodnoty BMF_k (pozri dodatok 7).

Po získaní hodnoty asimilačnej účinnosti (α) sa biomagnifikačný faktor môže vypočítať vynásobením hodnoty α rýchlostnou konštantou trávenia (I) a následným vydelením tohto výsledku (celkovou) hodnotou rýchlostnej konštanty depurácie (k_2). Hodnota biomagnifikačného faktora opravená vzhľadom na rast sa vypočíta rovnako, ale s použitím hodnoty rýchlostnej konštanty depurácie opravenej vzhľadom na rast(k_{2g}, pozri body 162 a 163). Alternatívny odhad hodnoty asimilačnej účinnosti je možné urobiť v prípade, že ryby zo vzorky boli podrobené analýze tkaniva v počiatočnej, lineárnej fáze vychytávania, pozri bod 151 a dodatok 7). Táto hodnota predstavuje nezávislý odhad asimilačnej účinnosti pre v podstate neexponovaný organizmus (*t. j.* u rýb tesne pred začiatkom vychytávacej fázy). Odhad hodnoty asimilačnej účinnosti z údajov v depuračnej fáze sa obyčajne používa na odvodenie hodnoty BMF.

Opravy vzhľadom na obsah lipidov a rast

Rast rýb počas depuračnej fázy môže znížiť hodnoty nameraných chemických koncentrácií v rybách, a tým spôsobiť, že celková hodnota rýchlostnej konštanty depurácie (k_2) bude vyššia ako pri samotných procesoch odbúravania (napr. metabolizmom, vypudením, pozri bod 72). Obsah lipidov v testovaných rybách (ktorý úzko súvisí s bioakumuláciou hydrofóbnych látok) a obsah lipidov v potrave sa môžu v praxi líšiť tak, aby sa ich hodnoty museli opraviť, ak majú byť hodnoty faktorov biomagnifikácie odvodené zmysluplným spôsobom. Hodnota biomagnifikačného faktora by sa mala opraviť vzhľadom na rast (podobne ako hodnota kinetického BCF pri skúške expozície vo vodnom prostredí), ako aj vzhľadom na obsah lipidov v potrave v porovnaní s obsahom lipidov v rybách (korekčný faktor lipidov). Rovnice a príklady týchto výpočtov sú uvedené v dodatku 5, resp. v dodatku 7.

Na účely opravy hodnôt vzhľadom na znižovanie koncentrácie látky vplyvom rastu ryby by sa mala vypočítať hodnota rýchlostnej konštanty depurácie opravená o rast (k_{2g}) (pozri rovnice v dodatku 5). Hodnota rýchlostnej konštanty depurácie opravená vzhľadom na rast (k_{2g}) sa potom použije na výpočet hodnoty

▼M7

biomagnifikačného faktora opravenej o rast tak, ako je uvedené v bode 73. Tento postup však v niektorých prípadoch nie je možný. Alternatívny postup, ktorým sa dá vyhnúť potrebe opravovať hodnoty o znižovanie koncentrácie látky vplyvom rastu, používa hmotnostné údaje o depurácii testovanej látky za každú rybu (celú rybu) namiesto bežných hmotnostných údajov o testovanej látke (koncentrácii) na jednotku hmotnosti ryby. To sa dá ľahko dosiahnuť, keďže v skúškach podľa tejto testovacej metódy by sa zaznamenané údaje o koncentrácii v tkanivách mali vzťahovať na individuálne hmotnosti rýb. Jednoduchý návod je uvedený v dodatku 5. Pripomíname, že hodnota k_2 by sa mala odhadovať a zaznamenávať aj vtedy, keď sa použije alternatívny postup.

Na účely opravy hodnôt vzhľadom na obsah lipidov v potrave a v rybách bez vykonania analýzy obsahu lipidov na všetkých rybách zo vzorky sa odvodia priemerné hodnoty lipidových frakcií (v hm. %) v rybách a potrave ([1]). Korekčný faktor lipidov (L_c) sa potom vypočíta vydelením priemeru lipidových frakcií v rybách priemerom lipidových frakcií v potrave. Hodnota biomagnifikačného faktora, podľa potreby opravená vzhľadom na rast, sa vydelí korekčným faktorom lipidov a získa sa hodnota biomagnifikačného faktora opravená vzhľadom na obsah lipidov.

Ak sa chemická analýza a analýza obsahu lipidov pri každom odbere vzoriek vykonajú na tých istých rybách, potom možno na výpočet hodnoty BMF opravenej o obsah lipidov použiť priamo údaje získané z tkanív jednotlivých rýb a opravené vzhľadom na obsah lipidov (pozri bod 37). Z grafu hodnôt koncentrácií opravených o obsah lipidov je možné získať hodnotu $C_{0,d}$ vzhľadom na obsah lipidov a hodnotu k_2. Potom je možné vykonať matematickú analýzu použitím rovnice v dodatku 7, pričom hodnota asimilačnej účinnosti (a) sa vypočíta použitím rýchlostnej konštanty trávenia potravy normalizovanej o obsah lipidov (I_{lipid}) a koncentrácie v potrave vzhľadom na obsah lipidov ($C_{food\text{-}lipid}$). Parametre opravené o obsah lipidov sa potom podobne použijú na výpočet BMF (pripomíname, že na výpočet hodnoty BMF_{KgL} opravenej vzhľadom na rast a obsah lipidov by sa oprava rýchlostnou konštantou rastu mala použiť aj v prípade lipidovej frakcie a nie vlhkej hmotnosti rýb).

Interpretácia výsledkov

Priemerný rast v testovanej i kontrolnej skupine by sa v zásade nemali výrazne odlišovať, aby sa vylúčili toxické účinky. Rýchlostné konštanty rastu alebo rastové krivky v oboch skupinách by sa mali vhodným spôsobom porovnať ([2]).

Skúšobný protokol

Po ukončení štúdie sa vypracuje záverečný protokol obsahujúci informácie o *testovanej látke, testovaných druhoch* a *podmienkach testu* podľa bodu 81 (ako v prípade skúšky expozície vo vodnom prostredí). Okrem toho sa vyžadujú tieto údaje:

Testovaná látka:

— akékoľvek informácie o stabilite testovanej látky v pripravenej potrave.

([1]) Tento postup je špecifický pre štúdie expozície z potravy a líši sa od postupu pri skúške expozície vo vodnom prostredí. Preto sa namiesto pojmu „normalizácia“ používa pojem „oprava“, aby sa predišlo ich zámene, pozri aj poznámku pod čiarou (37).

([2]) Môže sa vykonať *t*-skúška rýchlostných konštánt rastu na porovnanie rozdielov rastu medzi kontrolnou a testovanou skupinou, alebo *F*-skúška v prípade analýzy rozptylu. V prípade potreby môže použitie *F*-skúšky alebo skúšky miery pravdepodobnosti pomôcť pri výbere vhodného modelu rastu (OECD, monografia 54 (32).

▼M7

Podmienky testu:

— nominálna koncentrácia látky v potrave, metóda obohacovania, množstvo (lipidového) nosiča použité v procese obohacovania (ak sa použije), merania koncentrácií testovanej látky v obohatenom krmive pre každú analýzu (najmenej trikrát pred začiatkom štúdie a na konci vychytávacej fázy) a priemerné hodnoty,

— druh a kvalita nosiča s olejom alebo rozpúšťadlom (trieda, dodávateľ atď.) používaného na obohacovanie potravy, ak sa použije,

— druh použitej potravy (približná analýza [1]), trieda alebo kvalita, dodávateľ atď.), kŕmna dávka v priebehu vychytávacej fázy, množstvo a frekvencia podávanej potravy (vrátane akýchkoľvek jej úprav podľa hmotnosti rýb vo vzorke),

— čas, kedy boli ryby odobraté a usmrtené na účely chemickej analýzy pri každom odbere vzoriek (napr. jednu hodinu pred nasledujúcim dňom kŕmenia).

Výsledky:

— výsledky všetkých predbežných prípravných prác,

— informácie o všetkých pozorovaných nežiaducich účinkoch,

— úplný opis všetkých postupov použitých na chemickú analýzu vrátane detekčných a kvantifikačných limitov, odchýlok a výťažku,

— namerané koncentrácie lipidov v potrave (obohatenej i kontrolnej), individuálne hodnoty, priemerné hodnoty a štandardné odchýlky,

— tabuľkové údaje o hmotnosti (a dĺžke) za každú rybu z kontrolnej i exponovanej skupiny (napr. označením každej ryby vo vzorke jedinečným identifikátorom) a výpočty, odvodená hodnota rýchlostnej konštanty, resp. konštánt rastu a 95 % interval(-y) spoľahlivosti,

— tabuľkové hodnoty koncentrácií testovanej látky v rybách, priemerné koncentrácie namerané na konci vychytávacej fázy ($C_{0,m}$), a odvodená (celková) hodnota rýchlostnej konštanty depurácie (k_2) a koncentrácie v rybách na začiatku depuračnej fázy($C_{0,d}$) spolu s odchýlkami týchto hodnôt (smernica a úsek grafu),

— tabuľkové hodnoty obsahu lipidov (prípadne uvádzané spolu s konkrétnymi koncentráciami látky), priemerné hodnoty dosiahnuté v testovanej a kontrolnej skupine na začiatku skúšky, na konci vychytávania a konci depurácie,

— krivky (vrátane všetkých nameraných údajov) zobrazujúce (v prípade potreby sa môžu koncentrácie vyjadriť vo vzťahu k celému telu alebo k jeho konkrétnemu tkanivu) tieto parametre:

  — rast (*t. j.* hmotnosť rýb (a dĺžka) v závislosti od času) alebo prirodzený logaritmus transformácie hmotnosti v závislosti od času,

[1] Metódy analýzy potravín na bielkoviny, tuky, obsah hrubej vlákniny a popola; tieto informácie obyčajne poskytuje dodávateľ krmív.

▼M7

— depurácia testovanej látky v rybách a

— hodnota koncentrácie transformovanej prirodzeným logaritmom (ln koncentrácia) v porovnaní s časom depurácie (vrátane odvodenej hodnoty rýchlostnej konštanty depurácie k_2 a hodnoty koncentrácie v rybách odvodenej prirodzeným logaritmom na začiatku depuračnej fázy, $C_{0,d}$),

— ak sa vizuálnou kontrolou grafu zistia zjavné odľahlé hodnoty, môže sa použiť štatisticky platná skúška na odľahlé hodnoty, ktorou sa odstránia neopodstatnené údaje, a pridať odôvodnenie ich vynechania,

— výpočet rýchlostnej konštanty depurácie a hodnoty polčasu opravených vzhľadom na rast,

— výpočet hodnoty asimilačnej účinnosti (α),

— „hrubá“ hodnota potravového BMF, hodnota kinetického BMF opravená o obsah lipidov a rast („hrubá“ a opravená vzhľadom na obsah lipidov podľa vlhkej hmotnosti celej ryby), prípadne hodnota BMF pre jednotlivé tkanivá,

— všetky informácie o metabolitoch testovanej látky označených rádioaktívnym izotopom a o ich akumulovaní,

— čokoľvek nezvyčajné, čo sa počas testu pozorovalo, všetky odchýlky od týchto postupov a všetky iné významné informácie,

— súhrnná tabuľka s príslušnými nameranými a vypočítanými údajmi:

Rýchlostné konštanty depurácie a biomagnifikačné faktory látky (BMF_K)	
k_g (rýchlostná konštanta rastu, deň$^{-1}$):	vložte hodnotu (95 % CI) (1)
k_2 (celková rýchlostná konštanta depurácie, deň$^{-1}$):	vložte hodnotu (95 % CI)
k_{2g} (celková rýchlostná konštanta depurácie opravená o rast, deň$^{-1}$):	vložte hodnotu (95 % CI) (2)
$C_{0,m}$ (koncentrácia nameraná v čase nula, koncentrácia v rybách na konci vychytávania) (µg/g):	vložte hodnotu ± SD (2)
$C_{0,d}$ (odvodená hodnota koncentrácie v čase nula v depuračnej fáze, µg/g):	vložte hodnotu ± SD (2)
I (stanovená rýchlosť trávenia potravy, g potravy/g ryby za deň):	vložte hodnotu
I_g (efektívna rýchlosť trávenia potravy opravená vzhľadom na rast, g potravy/g ryby za deň) (2):	vložte hodnotu ± SD (2)
C_w (chemická koncentrácia v potrave, µg/g):	vložte hodnotu ± SD (2)
α (hodnota asimilačnej účinnosti látky):	vložte hodnotu ± SD (2)
BMF_K (hodnota kinetického potravového BMF):	vložte hodnotu (95 % CI) (1)

▼**M7**

Rýchlostné konštanty depurácie a biomagnifikačné faktory látky (BMF_K)	
BMF_{Kg} (hodnota kinetického potravového BMF opravená vzhľadom na rast):	vložte hodnotu (95 % CI) ([2])
$t_{1/2g}$ (hodnota polčasu opravená vzhľadom na rast, udávaná v dňoch):	vložte hodnotu ± SD ([2])
*L*c (korekčný faktor lipidov):	vložte hodnotu
BMF_{KgL} (hodnota kinetického BMF opravená o obsahov lipidov a rast):	vložte hodnotu
$BMF_{SS\text{-}L}$ (hodnota indikatívneho ustáleného BMF opravená vzhľadom na obsah lipidov) ([2]):	vložte hodnotu ± SD ([2])

([1]) CI: interval spoľahlivosti (ak sa dá zistiť)
([2]) SD: štandardná odchýlka (ak sa dá zistiť)

LITERATÚRA

1. Kapitola C.13 tejto prílohy, *Biokoncentrácia: prietokový rybí test.*

2. Kapitola A.6 tejto prílohy, *Rozpustnosť vo vode*

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. Kapitola A.8 tejto prílohy, Rozdeľovací koeficient *(n-oktanol/voda): metóda trepačkovej banky*.

5. Kapitola A.24 tejto prílohy, *Rozdeľovacia konštanta (n-oktanol/voda), metóda HPLC*.

6. Kapitola A.23 tejto prílohy, *Rozdeľovací koeficient (1-oktanol/voda): metóda pomalého miešania*.

7. Kapitola C.7 tejto prílohy, *Hydrolýza ako funkcia 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. Kapitola A.5 tejto prílohy, *Surface Tension of Aqueous Solutions*.

10. Kapitola A.4 tejto prílohy, *Tlak pary*.

11. Kapitola C.4 tejto prílohy, Stanovenie „ľahkej“ biodegradovateľnosti.

12. Kapitola C.29 tejto prílohy, Ľahká biodegradovateľnosť – *CO_2 v hermeticky uzavretých nádobách*

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. K dispozícii na webovej lokalite: 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. Kapitola C.47 tejto prílohy, Test toxicity v ranom štádiu vývoja rýb.

23. Kapitola C.15 tejto prílohy, *Ryby, krátkodobý test na embryách a vývojovom štádiu plodového vaku*.

24. Kapitola C.14 tejto prílohy, *Rastový test mláďat rýb*.

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

Dodatok 1

DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Asimilačná účinnosť (α) je mierou relatívneho množstva látky absorbovanej z čriev do organizmu (α je bezjednotková veličina, často sa však vyjadruje ako percentuálny podiel, a nie zlomok).

Bioakumulácia sa vo všeobecnosti označuje ako proces, v ktorom koncentrácia látky v organizme dosiahne úroveň, ktorá presahuje úroveň v respiračnom prostredí (napr. voda v prípade rýb alebo vzduch v prípade cicavcov), v strave alebo v kombinácii prostredia a potravy (1).

Biokoncentrácia je zvýšenie koncentrácie testovanej látky v organizme alebo na ňom (alebo v jeho špecifickom tkanive) vzhľadom na jej koncentráciu v okolitom prostredí.

Biokoncentračný faktor (BCF alebo K_B) v ktoromkoľvek čase počas vychytávacej fázy tohto akumulačného testu predstavuje koncentráciu testovanej látky v rybe/na jej povrchu alebo v jej špecifickom tkanive [C_f v mg/kg] vydelenú koncentráciou tejto látky v okolitom prostredí (C_w v mg/l). BCF sa vyjadruje v $l \cdot kg^{-1}$. Venujte pozornosť skutočnosti, že sa neprihliada na korekcie vzhľadom na rast ryby a/alebo štandardný obsah lipidov.

Biomagnifikácia je zvýšenie koncentrácie testovanej látky v organizme alebo na ňom (alebo v jeho špecifickom tkanive) vzhľadom na jej koncentráciu v potrave.

Biomagnifikačný faktor (BMF) je koncentrácia látky u predátora vzhľadom na jej koncentráciu v koristi (alebo potrave) predátora v ustálenom stave. V rámci metódy opísanej v tejto testovacej metóde sa dôsledne zabraňuje expozícii prostredníctvom vodnej fázy, a teda hodnotu BMF z tejto testovacej metódy nemožno priamo porovnávať s hodnotou BMF získanou v terénnej štúdii (v ktorej môže byť expozícia prostredníctvom vody a potravy kombinovaná).

Potravinový biomagnifikačný faktor je termín, ktorý v rámci tejto testovacej metódy slúži na opis výsledku testu expozície prostredníctvom potravy, kde sa dôsledne zabraňuje expozícii prostredníctvom vodnej fázy, a teda hodnotu BMF z tejto testovacej metódy nemožno priamo porovnávať s hodnotou BMF získanou v terénnej štúdii (v ktorej môže byť expozícia prostredníctvom vody a potravy kombinovaná).

Depuračná alebo poexpozičná (eliminačná) fáza je čas, ktorý nasleduje po premiestnení testovaných rýb z prostredia obsahujúceho testovanú látku do prostredia, v ktorom táto látka nie je prítomná, a počas ktorého sa skúma depurácia (alebo čistá eliminácia) danej látky z testovaných rýb (alebo z ich špecifických tkanív).

Rýchlostná konštanta depurácie (eliminácie) (k_2) je číselná hodnota definujúca rýchlosť znižovania koncentrácie testovanej látky v testovaných rybách (alebo ich špecifických tkanivách) po premiestnení testovaných rýb z prostredia obsahujúceho testovanú látku do prostredia, ktoré túto látku neobsahuje (k_2 sa vyjadruje v jednotkách $deň^{-1}$).

Rozpustený organický uhlík (DOC) je miera koncentrácie uhlíka pochádzajúceho z rozpustených organických zdrojov v testovanom prostredí.

Expozičná alebo vychytávacia fáza je čas, počas ktorého sú ryby vystavené testovanej látke.

Miera požitia potravy (I) je priemerné množstvo potravy, ktoré každý deň skonzumovala každá z rýb, a to vzhľadom na odhadovanú priemernú celkovú telesnú hmotnosť ryby (vyjadrené v g potravy/g ryby/deň).

▼M7

Kinetický biokoncentračný faktor (BCF_K) je pomer rýchlostnej konštanty vychytávania k_1 a rýchlostnej konštanty depurácie k_2 (t. j. k_1/k_2 – pozri zodpovedajúce definície v tomto dodatku). Táto hodnota by v zásade mala byť porovnateľná s hodnotou BCF_{SS} (pozri už uvedenú definíciu), môžu sa však vyskytnúť odchýlky, a to v prípade neistého ustáleného stavu alebo v prípade, že sa na kinetický BCF uplatnili korekcie vzhľadom na rast.

Lipidový normalizovaný kinetický biokoncentračný faktor (BCF_{KL}) sa normalizuje na rybu s 5 % obsahom lipidov.

Lipidový normalizovaný kinetický biokoncentračný faktor korigovaný vzhľadom na rast (BCF_{KgL}) sa normalizuje na rybu s 5 % obsahom lipidov a koriguje sa vzhľadom na rast počas obdobia štúdie, ako sa opisuje v dodatku 5.

Lipidový normalizovaný biokoncentračný faktor pri ustálenom stave (BCF_{SSL}) sa normalizuje na rybu s 5 % obsahom lipidov.

Na účely nariadenia REACH sa viaczložková látka definuje ako látka, v ktorej sa vyskytuje viac ako jedna hlavná zložka v koncentrácii od 10 % do 80 hm. %.

Rozdeľovacia konštanta oktanol-voda (K_{OW}) je pomer rozpustnosti látky v *n*-oktanole a vode v ustálenom stave [Metódy A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)]; vyjadruje sa aj ako P_{OW}. Logaritmus konštanty K_{OW} sa používa na vyjadrenie potenciálu látky biokoncentrovať sa vo vodných živočíchoch.

Časticový organický uhlík (POC) je miera koncentrácie uhlíka pochádzajúceho zo organických zdrojov vo forme suspenzie v testovanom prostredí.

Mikroextrakcia na tuhej fáze (SPME) je technika analýzy bez prítomnosti rozpúšťadla vyvinutá pre kvapalné systémy. V tejto metóde je vlákno potiahnuté polymérom vystavené plynnej alebo kvapalnej fáze, ktorá obsahuje predmetný analyt. Vo všeobecnosti je nutné prihliadať na (stanovený) minimálny čas analýzy s cieľom zaistiť rovnovážne podmienky medzi tuhou a kvapalnou fázou vzhľadom na druhy, ktoré sú predmetom testovania. Následne možno stanoviť koncentráciu predmetného analytu buď priamo z vlákna alebo po jeho extrakcii z vlákna do rozpúšťadla v závislosti od konkrétnej techniky stanovovania koncentrácie.

K dosiahnutiu ustáleného stavu dochádza, keď sa priebeh krivky v grafickom zobrazení závislosti obsahu testovanej látky v rybe (C_f) od času stáva paralelným s časovou osou a tri po sebe idúce analýzy C_f uskutočnené na vzorkách odobratých v minimálne dvojdňových intervaloch sa od seba neodlišujú o viac ako ± 20 % a ak v období medzi prvou a poslednou po sebe nasledujúcou analýzou nedošlo k žiadnemu významnému zvýšeniu C_f. Pri analyzovaní spájaných vzoriek je potrebné vykonať najmenej štyri po sebe idúce analýzy. Pri testovaných látkach s pomalým vychytávaním je primeranejšie uplatňovať sedemdňový interval.

Biokoncentračný faktor týkajúci sa ustáleného stavu (BCF_{SS}) sa počas predĺženého obdobia významne nemení, koncentrácia testovanej látky v okolitom prostredí je počas tohto obdobia konštantná (pozri definíciu ustáleného stavu).

Celkový organický uhlík (TOC) je miera koncentrácie uhlíka pochádzajúceho zo všetkých organických zdrojov v testovanom prostredí vrátane častíc a rozpustených zdrojov.

Rýchlostná konštanta vychytávania (k_1) je číselná hodnota, ktorou sa vymedzuje rýchlosť zvyšovania koncentrácie testovanej látky v/na testovaných rybách (alebo v ich špecifických tkanivách) pri ich expozícii danej látke (k_1 sa vyjadruje v l kg^{-1} za $deň^{-1}$).

Látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály sú známe ako UVCB.

▼**M7**

Chemikália je látka alebo zmes.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

LITERATÚRA

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. Kapitola A.8 tejto prílohy, *Rozdeľovacia konštanta* (*n*-oktanol-voda): *Metóda trepačkovej banky*

3. Kapitola A. 24 tejto prílohy, *Rozdeľovacia konštanta* (*n*-oktanol-voda), *metóda HPLC*.

4. Kapitola A.23 tejto prílohy, *Rozdeľovacia konštanta* (1-*oktanol*-*voda*): *Metóda pomalého miešania*.

▼M7

Dodatok 2

NIEKTORÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY VODY NA RIEDENIE

Zložka	Koncentračný limit
tuhé častice	5 mg/l
celkový organický uhlík	2 mg/l
neionizovaný amoniak	1 µg/l
zostatkový chlór	10 µg/l
celkové organofosfátové pesticídy	50 ng/l
celkové organochlórované pesticídy a polychlórované bifenyly	50 ng/l
celkový organický chlór	25 ng/l
hliník	1 µg/l
arzén	1 µg/l
chróm	1 µg/l
kobalt	1 µg/l
meď	1 µg/l
železo	1 µg/l
olovo	1 µg/l
nikel	1 µg/l
zinok	1 µg/l
kadmium	100 ng/l
ortuť	100 ng/l
striebro	100 ng/l

▼M7

Dodatok 3

DRUHY RÝB ODPORÚČANÉ NA TESTOVANIE

Odporúčaný druh	Odporúčaný rozsah testovacej teploty (°C)	Odporúčaná celková dĺžka testovaného zvieraťa (cm) ([2])
Danio rerio ([1]) (*Teleostei, Cyprinidae*) (Hamilton-Buchanan) danio pruhované	20 – 25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (*Teleostei, Cyprinidae*) (Rafinesque) čerebľa potočná	20 – 25	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (*Teleostei, Cyprinidae*) (Linnaeus) kapor rybničný	20 – 25	8,0 ± 4,0 ([3])
Oryzias latipes (*Teleostei, Poecilliidae*) (Temminck and Schlegel) ryžovníčka japonská	20 – 25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (*Teleostei, Poeciliidae*) (Peters) živorodka dúhová	20 – 25	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (*Teleostei Centrarchidae*) (Rafinesque) slnečnica sivomodrá	20 – 25	5,0 ± 2,0
Oncorhynchus mykiss (*Teleostei Salmonidae*) (Walbaum) pstruh dúhový	13 – 17	8,0 ± 4,0
Gasterosteus aculeatus (Teleostei, (Gasterosteidae) (Linnaeus) pichľavka siná	18 – 20	3,0 ± 1,0

([1]) Meyer *et al.* (1)

([2]) Treba poznamenať, že v samotnom teste sa ako meradlo rýchlostnej konštanty zmien veľkosti a rastu uprednostňuje hmotnosť. Uznáva sa však, že praktickejšou mierou je dĺžka, ak je nutné na začiatku experimentu uskutočniť výber ryby na základe pohľadu (t. j. z danej zásoby populácie).

([3]) Toto dĺžkové rozpätie sa uvádza v testovacích metódach pre nové chemické látky atď. na základe japonského zákona o kontrole chemických látok (CSCL).

Menej sa používajú rôzne brakické a morské druhy, napríklad:

sciéna (*Leiostomus xanthurus*)

kaprozúbka diamantová (*Cyprinodon variegatus*)

menídia pobrežná (*Menidia beryllina*)

príbojovka húfna (*Cymatogaster aggregata*)

platesa *Parophrys vetulus* (*Parophrys vetulus*)

hlaváč *Leptocottus armatus* (*Leptocottus armatus*)

pichľavka siná (*Gasterosteus aculeatus*)

morona striebristá (*Dicentracus labrax*)

belička európska (*Alburnus alburnus*)

▼**M7**

Sladkovodné ryby uvedené v tabuľke sa ľahko chovajú a/alebo sú široko dostupné počas celého roka, zatiaľ čo dostupnosť morských a brakických druhov je čiastočne obmedzená na príslušné krajiny. V podmienkach so zabezpečením kontroly nad výskytom ochorení a parazitov sa môžu rozmnožovať a chovať buď vo farmových chovoch alebo v laboratóriách, čím sa zabezpečí dobrý zdravotný stav a známy pôvod testovaných zvierat. Tieto ryby sú dostupné v mnohých častiach sveta.

LITERATÚRA

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

Dodatok 4

HARMONOGRAMY ODBEROV VZORIEK PRE TESTY EXPOZÍCIE PROSTREDNÍCTVOM VODNEJ FÁZY A TESTY EXPOZÍCIE PROSTREDNÍCTVOM POTRAVY

1. **Teoretický príklad harmonogramu odberov v prípade testu biokoncentrácie látky s log K_{OW} = 4 pri úplnej expozícii prostredníctvom vodnej fázy**

Odbery rýb	Harmonogram odberov		Počet vzoriek vody (1)	Počet rýb na vzorku (1)
	Minimálna požadovaná frekvencia odberov (dni) (2)	Dodatočné odbery (dni) (2)		
vychytávacia fáza				
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))
depuračná fáza				Premiestniť ryby do vody bez testovanej látky
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))
SPOLU				40 – 72 (48 – 80) (5)

(1) Čísla v zátvorkách udávajú počet vzoriek (vody, rýb), ktoré sa majú odobrať v prípade dodatočného odoberania vzoriek.
(2) Hodnota k2 odhadnutá pred testovaním pre látky s log K_{OW} rovným 4,0 je 0,652 dňa^{-1}. Celkové trvanie experimentu je 3 × t_{SS} = 3 × 4,6 dňa, t. j. 14 dní. Spôsob odhadu t_{SS} je uvedený v dodatku 5.
(3) Vodu odoberajte až po pridaní najmenej troch „objemov testovacej komory“.
(4) Tieto ryby sa odoberajú zo zásobnej populácie.
(5) Ak je potrebná väčšia presnosť alebo metabolické štúdie, ktoré si vyžadujú väčšie množstvo rýb, dané ryby by sa mali odoberať špecificky na konci vychytávacej a depuračnej fázy (pozri bod 40).
(6) Je možné, že na účely analýzy obsahu lipidov budú potrebné aspoň 3 ďalšie ryby, ak nie je možné použiť tie isté ryby, ktoré sa odobrali na účely stanovenia koncentrácií testovanej látky na začiatku testu, na konci vychytávacej fázy a na konci depuračnej fázy. Poznamenávame, že v mnohých prípadoch by malo byť možné používať iba uvedené 3 kontrolné ryby (pozri bod 56).

▼M7

2. **Teoretický príklad harmonogramu odberov vzoriek v prípade testu bioakumulácie látky prostredníctvom potravy po 10-dňovej vychytávacej fáze 42-dňovej depuračnej fáze.**

Odber vzorky	Harmonogram odberov		Počet vzoriek potravy	Počet rýb na vzorku	
	Deň v rámci fázy	Dodatočné vzorky rýb?		Testovaná skupina	Kontrolná skupina
vychytávacia faza					
1	0	možné (1) (2)	3 – testovaná skupina	0	5 – 10
			3 – kontrolná skupina (1)		(8 – 13) (2)
1A (3)	1 – 3			5 – 10	5 – 10
2	10	áno (4)	3 – testovaná skupina	10 – 15 (4)	5 – 10
			3 – kontrolná skupina (1)	(13 – 18) (5)	(8 – 13) (5)
depuračná fáza					
3	1	áno (4)		10 – 15 (4)	5 – 10
4	2			5 – 10	5 – 10
5	4			5 – 10	5 – 10
6	7	áno (4)		10 – 15 (4)	5 – 10
7	14			5 – 10	5 – 10
8	28			5 – 10	5 – 10
9	42	áno (4)		10 – 15 (4) (13 – 18) (5)	5 – 10 (8 – 13) (5)
SPOLU				59 – 120 (63 – 126) (4) (5)	50 – 110 (56 – 116) (4) (5)

(1) Na účely stanovenia koncentrácií testovanej látky a obsahu lipidov sa analyzovali 3 vzorky krmiva z kontrolnej, ako aj testovanej skupiny.

(2) Ryby sa odoberajú zo zásobnej populácie čo najskôr na začiatku štúdie; na účely stanovenia obsahu lipidov by sa mali na začiatku testu odobrať zo zásobnej populácie aspoň 3 ryby.

(3) (Nepovinné) Vďaka odberom v ranom štádiu vychytávacej fázy sa získajú údaje slúžiace na výpočet asimilácie testovanej látky prostredníctvom potravy, ktoré možno porovnať s asimilačnou účinnosťou vypočítanou na základe údajov týkajúcich sa depuračnej fázy.

(4) Analýze špecifických tkanív možno podrobiť 5 ďalších rýb.

(5) Je možné, že na účely analýzy obsahu lipidov budú potrebné aspoň 3 ďalšie ryby, ak nie je možné použiť tie isté ryby, ktoré sa odobrali na účely stanovenia koncentrácií testovanej látky na začiatku testu, na konci vychytávacej fázy a na konci depuračnej fázy. Poznamenávame, že v mnohých prípadoch by malo byť možné používať iba uvedené 3 kontrolné ryby (pozri body 56 a 153).

Poznámka k načasovaniu fáz a odberov vzoriek: Vychytávacia fáza sa začína prvým podaním krmiva s pridanou testovanou látkou. Pokusný deň trvá od jedného kŕmenia až takmer do druhého kŕmenia o 24 hodín neskôr. Prvý odber vzoriek (1 v tabuľke) by sa mal uskutočniť krátko (napríklad jednu hodinu) pred prvým kŕmením. Odber vzoriek v rámci štúdie by sa mal v ideálnom prípade vykonať krátko pred kŕmením uskutočneným v nasledujúci deň (t. j. približne 23 hodín po kŕmení v deň odberu vzoriek). Vychytávacia fáza sa skončí krátko pred prvým podaním krmiva bez pridanej testovanej látky, keď sa začína depuračná fáza (je pravdepodobné, že ryby z testovanej skupiny budú ešte tráviť krmivo s pridanou testovanou látkou v priebehu 24 hodín po poslednom podaní takejto stravy). To znamená, že krátko pred prvým podaním potravy bez pridanej testovanej látky by sa mala odobrať finálna vzorka z vychytávacej fázy a prvá vzorka z depuračnej fázy by sa mala odobrať približne 23 hodín po prvom podaní krmiva pridanej testovanej látky.

▼M7

Dodatok 5

VŠEOBECNÉ VÝPOČTY

1. Úvod

2. Predpoveď trvania vychytávacej fázy

3. Predpoveď trvania depuračnej fázy

4. Metóda postupného testovania: stanovenie rýchlostnej konštanty depurácie (eliminácie) k_2

5. Metóda postupného testovania: stanovenie rýchlostnej konštanty vychytávania k_1 (výlučne metóda s expozíciou prostredníctvom vody)

6. Simultánna metóda výpočtu rýchlostnej konštanty vychytávania a rýchlostnej konštanty depurácie (eliminácie) (výlučne metóda s expozíciou prostredníctvom vody)

7. Korekcia kinetického BCF a BMF vzhľadom na riedenie látky vplyvom rastu ryby

8. Normalizácia lipidov na 5 % obsah lipidov (výlučne metóda expozície prostredníctvom vody)

1. ÚVOD

Model všeobecnej bioakumulácie vo vodnom prostredí v prípade rýb možno charakterizovať na základe procesov vychytávania a eliminácie, pričom sa neberie do úvahy vychytávanie z potravy. Diferenciálna rovnica (dC_f/dt) opisujúca mieru zmeny koncentrácie látky v rybe (mg · kg^{-1} · deň$^{-1}$) je daná týmto vzťahom (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \qquad \text{[rovnica A5.1]}$$

kde:

k_1 = rýchlostná konštanta prvého rádu týkajúca sa vychytávania látky rybou (l · kg^{-1} · deň$^{-1}$).

k_2 = rýchlostná konštanta prvého rádu týkajúca sa depurácie látky z ryby (deň$^{-1}$).

k_g = rýchlostná konštanta prvého rádu týkajúca sa rastu ryby („riedenie vplyvom rastu“) (deň$^{-1}$).

k_m = rýchlostná konštanta prvého rádu týkajúca sa metabolickej transformácie (deň$^{-1}$).

k_e = rýchlostná konštanta prvého rádu týkajúca sa vylúčenia vo forme fekálií (deň$^{-1}$).

C_w = koncentrácia vo vode (mg · l^{-1}).

C_f = koncentrácia v rybe (mg · kg^{-1} vlhkej hmotnosti).

V prípade bioakumulatívnych látok možno očakávať, že časovo vážený priemer koncentrácií (TWA) je najvýznamnejšou expozičnou koncentráciou vo vode (C_w) v rámci prípustného rozsahu fluktuácie (pozri bod 24). Odporúča sa vypočítať koncentráciu TWA vo vode podľa postupu uvedeného v dodatku 6 testovacej metódy C.20 (2). Treba poznamenať, že logarimtická (ln) transformácia koncentrácie látky vo vode je vhodná vtedy, keď sa medzi obdobiami obnovy očakáva exponenciálny rozkladný proces, napr. pri polostatickom pláne testu. V prietokovom systéme možno nebude potrebná logaritmická (ln) transformácia expozičných koncentrácií. V prípade odvodených koncentrácií TWA vo vode by sa tieto koncentrácie mali zaznamenať a použiť v ďalších výpočtoch.

Pri štandardnom teste BCF na rybách možno vychytávanie a depuráciu charakterizovať na základe dvoch kinetických procesov prvého rádu.

▼M7

rýchlosť vychytávania = $k_1 \times C_w$ [rovnica A5.2]

celková rýchlosť eliminácie = $(k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f$ [rovnica A5.3]

V ustálenom stave za predpokladu zanedbateľného rastu a metabolizmu (t. j. hodnoty k_g a k_m nemožno odlíšiť od nuly) sa miera vychytávania rovná miere depurácie, a tak z kombinácie rovnice A5.2 a rovnice A5.3 vyplýva takýto vzťah:

$$BCF = \frac{C_{f-SS}}{C_{w-SS}} = \frac{k_1}{k_2} \quad \text{[rovnica A5.4]}$$

kde:

$C_{f\text{-}SS}$ = koncentrácia v rybe v ustálenom stave (mg · kg^{-1} vlhkej hmotnosti).

$C_{w\text{-}SS}$ = koncentrácia vo vode v ustálenom stave (mg l^{-1}).

Pomer k_1/k_2, známy ako kinetický BCF (BCF_K), by sa mal rovnať BCF v ustálenom stave (BCF_{SS}) získanému z pomeru koncentrácie v rybách a koncentrácie vo vode v ustálenom stave. Ak bol však ustálený stav neistý alebo sa na kinetický BCF uplatnili korekcie vzhľadom na rast, môžu sa vyskytnúť odchýlky. No keďže k_1 a k_2 sú konštanty, na odvodenie BCF_K nie je potrebné dosiahnuť ustálený stav.

Na základe týchto rovníc prvého rádu obsahuje tento dodatok 5 všeobecné výpočty nevyhnutné pre metódu bioakumulácie na základe expozície prostredníctvom vody, ako aj metódu bioakumulácie na základe expozície prostredníctvom potravy. Oddiely 5, 6 a 8 však majú význam len z hľadiska metódy týkajúcej sa expozície prostredníctvom vody, no uvádzame ich tiež, keďže ide o „všeobecné“ techniky. Vďaka metóde postupného testovania (oddiely 4 a 5) a simultánnej metóde (oddiel 6) možno vypočítať konštanty vychytávania a depurácie, ktoré sa použijú na odvodenie kinetických BCF. Metóda postupného testovania na účely stanovenia hodnoty k_2 (oddiel 4) má význam z hľadiska metódy týkajúcej sa expozície prostredníctvom potravy, keďže uvedená hodnota je potrebná na výpočet účinnosti asimilácie, ako aj BMF. V dodatku 7 sa podrobne uvádzajú výpočty, ktoré sú špecifické pre metódu týkajúcu sa expozície prostredníctvom potravy.

2. PREDPOVEĎ TRVANIA VYCHYTÁVACEJ FÁZY

Pred vykonaním testu možno na základe empirických vzťahov medzi k_2 a rozdeľovacou konštantou n-oktanol-voda (K_{OW}) alebo medzi k_1 a BCF odhadnúť hodnotu konštanty k_2, a tým aj istú percentuálnu hodnotu času potrebného na dosiahnutie ustáleného stavu. Treba si však uvedomiť, že rovnice uvedené v tomto oddiele platia iba vtedy, keď sa vychytávanie a depurácia riadia kinetikou prvého rádu. Ak zjavne nejde o tento prípad, v prípade, že sú prognózy týkajúce sa vychytávacej fázy žiaduce, odporúčame požiadať o konzultácie odborníkov v oblasti biostatiky a/alebo farmakokinetiky.

Odhad hodnoty k_2 (deň$^{-1}$) možno získať viacerými metódami. V prvom rade možno použiť napríklad tieto empirické vzťahy ([1]):

$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \log K_{OW}$ ($r^2 = 0{,}95$) [(3); [rovnica A5.5]

alebo

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF} \quad \text{[rovnica A5.6]}$$

kde $k_1 = 520 \times W^{-0{,}32}$ (v prípade látok s $\log K_{OW} > 3$) ($r^2 = 0{,}85$)[(4); [rovnica A5.7]

([1]) Ako pri všetkých empirických vzťahoch by sa malo overiť, či testovaná látka patrí do oblasti uplatniteľnosti daného vzťahu.

▼M7

$$aBCF = 10^{(0{,}910 \cdot logK_{OW} - 1{,}975 \cdot log(6{,}8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0{,}786)} \quad (r^2 = 0{,}90)[(5);\ \text{[rovnica A5.8]}$$

W = priemerná hmotnosť ryby ovplyvnenej chemikáliou (v gramoch vlhkej hmotnosti) na konci vychytávacej fázy/začiatku depuračnej fázy ([1])

Pre ďalšie súvisiace vzťahy pozri (6). Pri odhade k_2 môže byť výhodné uplatniť komplikovanejšie modely, ak napríklad existuje pravdepodobnosť, že dôjde k významnému metabolizmu (7) (8). Pri náročnejších modeloch však treba pri interpretácii prognóz postupovať opatrnejšie. Napríklad prítomnosť nitroskupín môže poukazovať na rýchly metabolizmus, no vždy to tak nie je. Používateľ by preto mal pri časovom plánovaní štúdie zvážiť výsledky prognostických metód vzhľadom na chemickú štruktúru a všetky ďalšie relevantné informácie (napríklad predbežné štúdie).

Na základe odhadu k_2– a za predpokladu, že rast a metabolizmus sú zanedbateľné, možno zo všeobecnej kinetickej rovnice udávajúcej vychytávanie a depuráciu (kinetika prvého rádu) zistiť čas potrebný na dosiahnutie istého percentuálneho podielu ustáleného stavu. Ak počas štúdie dôjde k výraznému rastu, ďalej opísané odhady nebudú spoľahlivé. V takýchto prípadoch je vhodnejšie použiť konštantu k_{2g} korigovanú vzhľadom na rast, ako sa opisuje ďalej v texte (pozri oddiel 7 tohto dodatku):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_f \quad \text{[rovnica A5.9]}$$

alebo v prípade, že koncentrácia C_w je konštantná:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{[rovnica A5.10]}$$

V blízkosti ustáleného stavu ($t \rightarrow \infty$) možno rovnicu A5.10 zjednodušiť na vzťah [*pozri* (9) (10)]:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W \quad \text{[rovnica A5.11]}$$

alebo

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \quad \text{[rovnica A5.12]}$$

Hodnota súčinu BCF × C_w sa približuje koncentrácii v rybách pri ustálenom stave ($C_{f\text{-}SS}$). [Poznámka: rovnaký prístup možno uplatniť pri odhade BMF pri ustálenom stave v prípade testu expozície prostredníctvom potravy. V tomto prípade sa vo vyššie uvedených rovniciach nahrádza faktor BCF faktorom BMF a koncentrácia C_w sa nahrádza koncentráciou v potrave C_{food}.]

Rovnica A5.10 sa dá prepísať ako:

$$C_f = C_{f-SS}(1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{[rovnica A5.13]}$$

alebo

$$\frac{C_f}{C_{f-SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad \text{[rovnica A5.14]}$$

Z rovnice A5.14 možno predpovedať čas na dosiahnutie určitého percentuálneho podielu ustáleného stavu, keď sa predbežný odhad hodnoty k_2 uskutoční na základe rovnice A5.5 alebo rovnice A5.6.

Na orientáciu uveďme, že štatisticky optimálna dĺžka trvania vychytávacej fázy na získanie štatisticky prijateľných údajov (BCF_K) je čas, za ktorý

([1]) Hmotnosť rýb na konci vychytávacej fázy možno odhadnúť na základe údajov z predchádzajúcej štúdie alebo na základe poznatkov týkajúcich sa pravdepodobného zvýšenia veľkosti testovaných druhov z typickej hmotnosti na začiatku testovania a v priebehu typického trvania fázy vychytávania (napr. 28 dní).

▼M7

dosiahne krivka závislosti logaritmu koncentrácie testovanej látky v rybách od lineárneho času aspoň 50 % ustáleného stavu (t. j. $0{,}69/k_2$), nie však viac 95 % ustáleného stavu (t. j. $3{,}0/k_2$) (11). Výpočet BCF_{SS} možno zrealizovať vtedy, ak akumulácia presahuje 95 % ustáleného stavu.

Čas na dosiahnutie 80 % ustáleného stavu je (s využitím rovnice A5.14):

$$0{,}80 = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[rovnica A5.15]}$$

alebo

$$t_{80} = \frac{-\ln(0{,}20)}{k_2} = \frac{1{,}6}{k_2} \qquad \text{[rovnica A5.16]}$$

Obdobne čas na dosiahnutie 95 % ustáleného stavu je:

$$t_{95} = \frac{-ln\,(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2} \qquad \text{[rovnica A5.17]}$$

Napríklad trvanie vychytávacej fázy (t. j času na dosiahnutie istého percentuálneho podielu ustáleného stavu, napr. t_{80} alebo t_{95}) v prípade testovanej látky s log K_{OW} = 4 by predstavovalo (s použitím rovnice A5.5, rovnice A5.16 a rovnice A5.17):

$$logk_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0{,}652 \text{ deň}^{-1}$$

$$t80 = \frac{1{,}6}{0{,}652} = 2{,}45\ dňa(59 hodín)$$

alebo $t_{95} = \frac{3{,}0}{0{,}652} = 4{,}60\ dňa(110 hodín)$

alternatívne, výraz:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55{,}31\ (hodín) \qquad \text{[rovnica A5.18]}$$

možno použiť na vypočítanie času potrebného na dosiahnutie efektívneho ustáleného stavu (t_{eSS}) (12). V prípade látky s log K_{OW} = 4 sa dospeje k tomuto výsledku:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55{,}31 = 121\ hodín$$

3. PREDPOVEĎ TRVANIA DEPURAČNEJ FÁZY

Predpoveď času potrebného na zníženie záťaže organizmu na určitý percentuálny podiel počiatočnej koncentrácie možno získať aj zo všeobecnej rovnice udávajúcej vychytávanie a depuráciu [za predpokladu kinetiky prvého rádu, pozri rovnicu A5.9 (1) (13)].

Pokiaľ ide o depuračnú fázu, predpokladá sa, že koncentrácia C_w (alebo koncentrácia C_{food} v prípade testu expozície prostredníctvom potravy) sa rovná nule. Rovnicu možno preto zjednodušiť na vzťah:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \qquad \text{[rovnica A5.19]}$$

alebo

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \qquad \text{[rovnica A5.20],}$$

kde $C_{f,0}$ je koncentrácia na začiatku depuračnej fázy.

50 % depurácia sa potom dosiahne za čas (t_{50}):

▼M7

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

alebo

$$t_{50} = \frac{-\ln(0{,}50)}{k_2} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

Obdobne možno vypočítať, že 95 % depurácia sa dosiahne za:

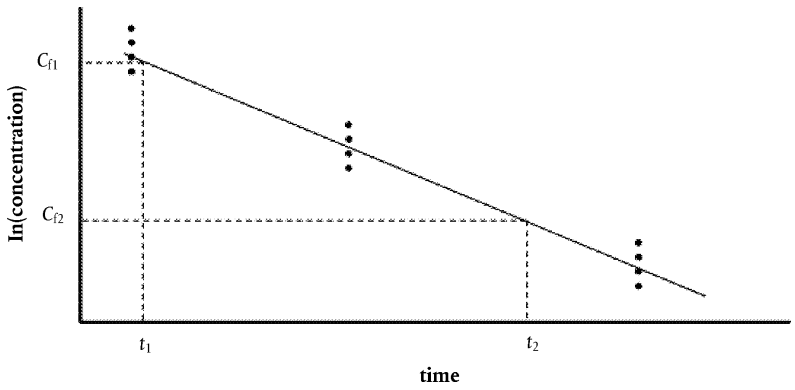
$$t_{95} = \frac{-\ln(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

Ak sa v prvom období dosiahne 80 % vychytávanie ($1{,}6/k_2$) a eliminácia počas depuračnej fázy predstavuje 95 % ($3{,}0/k_2$), potom depuračná fáza trvá približne dvakrát tak dlho ako vychytávacia fáza.

Upozorňujeme, že tieto odhady vychádzajú z predpokladu, že procesy vychytávania a depurácie sa riadia kinetikou prvého rádu. Ak je zrejmé, že nejde o kinetiku prvého rádu, tieto odhady nie sú validné.

4. METÓDA POSTUPNÉHO TESTOVANIA: STANOVENIE RÝCHLOSTNEJ KONŠTANTY DEPURÁCIE (ELIMINÁCIE) K_2

Pri väčšine údajov týkajúcich sa biokoncentrácie sa predpokladá, že sú „dostatočne uspokojivo“ opísané pomocou modelu pozostávajúceho z dvoch kompartmentov/dvoch parametrov, ako to vyplýva z priamky, ktorá je aproximáciou bodov koncentrácií testovanej látky v rybách [na prirodzenej logaritmickej (ln) stupnici] počas depuračnej fázy.



Treba si uvedomiť, že odchýlky od lineárneho priebehu môžu poukazovať na komplikovanejší priebeh depurácie ako ten, ktorý podlieha kinetike prvého rádu. Pri riešení druhov depurácie, ktoré nepodliehajú kinetike prvého rádu, možno uplatniť grafickú metódu.

Na výpočet k_2 pri niekoľkých časových bodoch (bodoch odberu vzoriek) uskutočnite lineárnu regresiu prirodzeného logaritmu (koncentrácie) v závislosti od času. Smernica regresnej priamky je odhadom rýchlostnej konštanty depurácie k_2 ([1]). Z daného úseku možno jednoducho vypočítať priemernú koncentráciu látky v rybách na začiatku depuračnej fázy ($C_{0,d}$, čo sa rovná priemernej koncentrácii v rybách na konci vychytávacej fázy) (vrátane tolerancií chyby) ([1]):

([1]) Vo väčšine programov, v ktorých je možná lineárna regresia, sa udávajú aj štandardné chyby a interval spoľahlivosti (CI) odhadov, napr. v programe Microsoft Excel sa využíva súbor nástrojov na analýzu údajov.

▼M7

$$C_{0,d} = e^{\text{intercept}} \qquad \text{[rovnica A5.21]}$$

Keď sú na výpočet k_2 k dispozícii len dva časové (odberové) body (ako v minimalizovanom pláne), do uvedenej rovnice dosaďte dané dve priemerné koncentrácie,

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1} \qquad \text{[rovnica A5.22]},$$

kde $\ln(C_{f1})$ je prirodzený logaritmus koncentrácie v čase t_1 a $\ln(C_{f2})$ je prirodzený logaritmus koncentrácie v čase t_2, pričom t_2 a t_1 sú časy, kedy došlo k odberu predmetných dvoch vzoriek vzhľadom na začiatok depurácie ([1]).

5. METÓDA POSTUPNÉHO TESTOVANIA: STANOVENIE RÝCHLOSTNEJ KONŠTANTY VYCHYTÁVANIA K_1 (VÝLUČNE METÓDA S EXPOZÍCIOU PROSTREDNÍCTVOM VODY)

Na zistenie hodnoty k_1 na základe súboru postupných časových údajov týkajúcich sa koncentrácie vo vychytávacej fáze použite počítačový program zodpovedajúci tomuto modelu:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[rovnica A5.23]},$$

kde k_2 vyplýva z predchádzajúceho výpočtu, C_f (t) je koncentrácia látky v rybách a C_w (t) je koncentrácia látky vo vode v čase t.

Keď sú na výpočet k_1 k dispozícii len dva časové (odberové) body (ako v minimalizovanom pláne), použite túto rovnicu:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{[rovnica A5.24]},$$

kde k_2 vyplýva z predchádzajúceho výpočtu, C_f je koncentrácia látky v rybách na začiatku depuračnej fázy a C_w je priemerná koncentrácia látky vo vode počas vychytávacej fázy ([2]).

Na posúdenie správnosti výsledku fitovania možno použiť vizuálnu kontrolu smerníc priamok k_1 a k_2 vynesených v závislosti od nameraných údajov týkajúcich sa bodov odberu. Ak sa ukáže, že metóda postupného testovania priniesla nedostatočný odhad k_1, potom by sa mal uplatniť simultánny prístup k výpočtu konštánt k_1 a k_2 (pozri oddiel 6 ďalej). Na účely vizuálnej kontroly správnosti výsledku fitovania by sa mali výsledné smernice opäť porovnať so znázornenými nameranými údajmi. Ak je správnosť výsledku fitovania naďalej nedostatočná, môže z toho vyplývať, že nejde o kinetiku prvého rádu, a preto by sa mali využiť iné, zložitejšie modely.

6. SIMULTÁNNA METÓDA VÝPOČTU RÝCHLOSTNEJ KONŠTANTY VYCHYTÁVANIA A RÝCHLOSTNEJ KONŠTANTY DEPURÁCIE (ELIMINÁCIE) (VÝLUČNE METÓDA S EXPOZÍCIOU PROSTREDNÍCTVOM VODY)

Na zistenie hodnôt k_1 a k_2 možno použiť počítačové programy, a to na základe súboru postupných časových údajov týkajúcich sa koncentrácie a s využitím tohto modelu:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[rovnica A5.25]}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[rovnica A5.26]},$$

kde

t_c = čas na konci vychytávacej fázy.

Tento prístup priamo poskytuje štandardné chyby odhadov konštánt k_1 a k_2. Ak sa v rovniciach A5.25 a A5.26 k_1/k_2 nahradí faktorom BCF (pozri rovnicu A5.4), možno odhadnúť aj štandardnú chybu a 95 % interval spoľahlivosti

([1]) Na rozdiel od metódy lineárnej regresie sa na základe tohto vzorca nevypočíta štandardná chyba pre konštantu k 2.

([2]) Na rozdiel od postupu lineárneho fitovania sa na základe tejto metódy zvyčajne nezistí štandardná chyba ani interval spoľahlivosti pre odhadovanú konštantu k1.

▼M7

faktoru BCF. Toto je obzvlášť praktické pri porovnávaní rôznych odhadov v dôsledku transformácie údajov. Závislú premennú (koncentráciu látky v rybách) možno fitovať s logaritmickou transformáciou alebo bez nej, pričom možno vyhodnotiť výslednú neistotu BCF.

Keďže medzi uvedenými dvoma parametrami k_1 a k_2 existuje silná korelácia (ak sa odhadujú simultánne), možno by bolo vhodnejšie najprv vypočítať hodnotu k_2 výlučne z údajov o depurácii (pozri vyššie);z depuračnej krivky možno vo väčšine prípadov s pomerne vysokou presnosťou odhadnúť konštantu k_2. Následne možno z údajov týkajúcich sa vychytávania s použitím nelineárnej regresie vypočítať hodnotu k_1 ([1]). Odporúča sa použiť rovnaký postup transformácie údajov ako pri postupnom fitovaní.

Na posúdenie správnosti výsledku fitovania možno použiť vizuálnu kontrolu výsledných smerníc znázornených priamok vynesených v závislosti od nameraných údajov týkajúcich sa bodov odberu. Ak sa ukáže, že z tejto metódy vyplynul nedostatočný odhad k_1, potom možno uplatniť simultánny prístup k výpočtu konštánt k_1 a k_2. Na účely vizuálnej kontroly správnosti výsledku fitovania by sa mal fitovaný model opäť porovnať s nameranými údajmi vynesenými do grafu. Potom by sa mali výsledné parametrové odhady konštánt k_1, *a* k_2 a výsledný faktor BCF, ako aj s nimi súvisiace štandardné chyby a/alebo intervaly spoľahlivosti porovnať vzhľadom na jednotlivé druhy fitovania.

Ak je správnosť výsledku fitovania nedostatočná, môže z toho vyplývať, že nejde o kinetiku prvého rádu, a preto by sa mali využiť iné, zložitejšie modely. Jednou z najčastejších komplikácií je rast rýb počas testu.

7. KOREKCIA KINETICKÉHO BCF A BMF VZHĽADOM NA RIEDENIE LÁTKY VPLYVOM RASTU RYBY

V tomto oddiele sa opisuje štandardná metóda korekcie vzhľadom na rast rýb počas testu (tzv. „riedenie látky vplyvom rastu ryby“), ktorá je validná len pri uplatnení kinetiky prvého rádu. V prípade náznakov neuplatňovania kinetiky prvého rádu vám odporúčame, aby ste v záujme riadnej korekcie vzhľadom na riedenie látky vplyvom rastu ryby požiadali o konzultácie odborníka v oblasti biostatiky, prípadne uplatnili hmotnostný prístup opísaný ďalej.

Tejto metóde, ktorá je zameraná na korekciu faktorov vzhľadom na riedenie látky vplyvom rastu ryby, chýba v niektorých prípadoch istá presnosť, respektíve niekedy nefunguje (napríklad v prípade látok s veľmi pomalou depuráciou, ktoré sa testujú na rýchlorastúcich rybách, môže byť konštanta k_{2g}, teda odvodená rýchlostná konštanta depurácie korigovaná vzhľadom na riedenie látky vplyvom rastu ryby, veľmi malá, a teda chyba v dvoch rýchlostných konštantách, ktoré sa použili na jej odvodenie, nadobudla kritický charakter, pričom v niektorých prípadoch môžu byť odhady konštanty k_g väčšie ako k_2). V takýchto prípadoch možno uplatniť alternatívny prístup (t. j. hmotnostný prístup), ktorý funguje aj v prípade, že nejde o kinetiku prvého rádu, vďaka čomu netreba vykonať korekciu. Tento prístup sa uvádza na konci tohto oddielu.

Metóda odpočítania rýchlostnej konštanty rastu na účely korekcie vzhľadom na rast

Na účely štandardnej metódy sú všetky individuálne údaje týkajúce sa hmotnosti a dĺžky prevedené na prirodzené logaritmy, pričom sú logaritmické údaje, t. j. ln(hmotnosť) alebo ln(1/hmotnosť) znázornené v závislosti od času (deň), a to osobitne v prípade ovplyvňovaných a kontrolných skupín. Rovnaký postup sa uplatňuje v prípade údajov z vychytávacej a depuračnej fázy, ku ktorým sa pristupuje oddelene. Všeobecne platí, že v súvislosti s korekciou vzhľadom na riedenie vplyvom rastu ryby je na odvodenie

([1]) Treba si uvedomiť si, že neistota odhadu konštanty k2 sa pri modeli bioakumulácie nevyužíva správne, keď sa tento model v zásade považuje za konštantný pri fitovaní konštanty k1 v rámci metódy postupného fitovania. Výsledná neistota BCF sa preto bude pri simultánnej metóde a metóde postupného fitovania líšiť.

▼M7

rýchlostnej konštanty rastu (k_g) vhodnejšie použiť hmotnostné údaje z celej štúdie, no zo štatisticky významných rozdielov medzi rýchlostnými konštantami rastu odvodenými pre vychytávaciu a depuračnú fázu môže vyplývať, že by sa mala použiť rýchlostná konštanta depuračnej fázy. Celkové rýchlosti rastu získané zo štúdií vo vodnom prostredí, ktoré sa týkajú testovaných a kontrolných skupín, možno použiť na kontrolu rôznych účinkov v súvislosti s ovplyvňovaním danou chemikáliou.

Štandardnými štatistickými postupmi sa vypočíta korelácia lineárnej regresie (lineárna korelácia najmenších štvorcov) pre logaritmus ln(hmotnosť ryby) v závislosti od času (v dňoch) [ako aj pre ln(1/hmotnosť v závislosti od času (v dňoch)] pre každú skupinu (testované a kontrolné skupiny, individuálne údaje, nie denné priemerné hodnoty), a to pre celú štúdiu, pre vychytávaciu fázu a depuračnú fázu. Na účely vyhodnotenia štatistickej významnosti (p = 0,05) rozdielu medzi smernicami (rýchlostné konštanty rastu) sa používa vypočítaný rozptyl smerníc priamok, a to s použitím Studentovho t-testu (alebo analýzy ANOVA v prípade testovania viacerých koncentrácií). Na účely korekcie vzhľadom na rast sa vo všeobecnosti uprednostňujú údaje o hmotnosti. Obdobne sa pristupuje aj k údajom o dĺžke. Môžu sa použiť na porovnanie kontrolných a testovaných skupín v súvislosti s účinkami testovania. Ak neexistuje žiadny štatisticky významný rozdiel v analýze údajov o hmotnosti, údaje z testu a kontroly možno zlúčiť. Okrem toho možno vypočítať celkovú rýchlostnú konštantu rastu ryby za celú štúdiu (k_g) ako celkovú smernicu lineárnej korelácie. Ak sa zistia štatisticky významné rozdiely, rýchlostné konštanty rastu sa vykazujú osobitne za každú skupinu rýb a/alebo fázu štúdie. Rýchlostné konštanty každej ovplyvnenej skupiny by sa potom mali použiť na účely korekcie riedenia látky vplyvom rastu rýb v danej skupine. Ak sa zaznamenali štatistické rozdiely medzi rýchlostnými konštantami vychytávacej a depuračnej fázy, mala by sa použiť odvodená rýchlostná konštanta depuračnej fázy.

Vypočítanú rýchlostnú konštantu rastu (k_g vyjadrenú v dňoch^{-1}) možno odpočítať od celkovej rýchlostnej konštanty depurácie (k_2), na základe čoho sa získa rýchlostná konštanta depurácie k_{2g}.

$$k_{2\ g} = k_2 - k_g \qquad \text{[rovnica A5.27]}$$

Rýchlostná konštanta vychytávania sa vydelí rýchlostnou konštantou depurácie korigovanou vzhľadom na rast, na základe čoho sa získa kinetický BCF korigovaný vzhľadom na rast, ktorý sa označuje ako BCF_{Kg} (alebo BMF_{Kg}).

$$BCF_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \qquad \text{[rovnica A5.28],}$$

V rovnici A7.5 sa na výpočet BMF_{Kg} korigovaného vzhľadom na rast používa rýchlostná konštanta rastu odvodená na účely štúdie s podávaním potravy (pozri dodatok 7).

Hmotnostná metóda na účely korekcie vzhľadom na rast

Namiesto už uvedenej „metódy odpočítania rýchlostnej konštanty rastu“ možno ako alternatívu použiť túto metódu, pri ktorej netreba uplatniť korekciu vzhľadom na rast. Základ spočíva vo využívaní údajov o depurácii na hmotnostnom základe (v súvislosti s celou rybou), a teda nie údajov týkajúcich sa koncentrácie.

Preveďte koncentrácie látky v tkanive zistené počas depuračnej fázy (hmotnosť testovanej látky na jednotkovú hmotnosť ryby) na hmotnosť testovanej látky/ryba: priraďte koncentrácie a hmotnosti jednotlivých rýb v tabuľkovej forme (napr. pomocou počítačového tabuľkového procesoru) a pre dané meranie vynásobte každú koncentráciu celkovou hmotnosťou ryby s cieľom určiť súbor podielov hmotnostný údaj o testovanej látke/ryba pre všetky vzorky získané počas depuračnej fázy.

Vyneste výsledný prirodzený logaritmus hmotnostných údajov o látke v závislosti od času experimentu (depuračná fáza) do grafu ako pri bežnom postupe.

▼M7

V prípade metódy expozície vo vodnom prostredí rutinným spôsobom odvoďte rýchlostnú konštantu vychytávania (pozri oddiely 4 a 6). Pripomíname, že v rovniciach zameraných na fitovanie krivky v súvislosti s konštantou k_1 by sa mala použiť „normálna“ hodnota k_2. Z vyššie uvedených údajov odvoďte rýchlostnú konštantu depurácie. Pretože výsledná hodnota rýchlostnej konštanty depurácie je nezávislá od rastu, keďže sme ju odvodili na základe hmotnosti vzhľadom na celú rybu, mala by sa označiť ako k_{2g}, a nie ako k_2.

8. NORMALIZÁCIA LIPIDOV NA 5 % OBSAH LIPIDOV (VÝLUČNE METÓDA EXPOZÍCIE PROSTREDNÍCTVOM VODY)

Ak nemožno potvrdiť, že sa testovaná látka primárne akumuluje v lipidoch (s bielkovinami sa môžu napr. viazať niektoré plnofluórované látky), výsledky BCF (v kinetickom a ustálenom stave) vyplývajúce z testov zameraných na expozíciu prostredníctvom vody by sa mali vykazovať aj vo vzťahu k štandardnému obsahu lipidov v rybách, ktorý predstavuje 5 % vlhkej hmotnosti. Údaje o koncentráciách rýb alebo BCF je potrebné previesť na 5 % obsah lipidov pri vlhkej hmotnosti. Ak sa na meranie koncentrácií látky a obsahu lipidov vo všetkých bodoch odberu vzoriek použili tie isté ryby, v takom prípade je nevyhnutné korigovať každú jednu nameranú koncentráciu látky v rybe vzhľadom na obsah lipidov danej ryby.

$$C_{f,L} = \frac{0{,}05}{L} \cdot C_f \qquad \text{[rovnica A5.29]},$$

kde

$C_{f,L}$ = lipidová normalizovaná koncentrácia v rybe (mg kg^{-1} vlhkej hmotnosti)

L = lipidová frakcia (na základe vlhkej hmotnosti)

C_f = koncentrácia testovanej látky v rybe (mg kg^{-1} vlhkej hmotnosti)

Ak sa analýza lipidov neuskutočnila na všetkých rybách vo vzorke, na normalizáciu BCF sa použije priemerná lipidová hodnota. V prípade BCF pri ustálenom stave by sa mala použiť priemerná hodnota zaznamenaná na konci fázy vychytávania v ovplyvnenej skupine. Pri normalizácii kinetického BCF môžu existovať prípady odôvodneného uplatnenia iného prístupu, napríklad vtedy, ak sa počas vychytávacej alebo depuračnej fázy značne zmenil obsah lipidov. Miera kŕmenia, ktorou sa minimalizujú dramatické zmeny obsahu lipidov by sa však mala rutinne používať.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \qquad \text{[rovnica A5.30]}$$

kde

BCF_{KL} = lipidový normalizovaný kinetický BCF (L kg^{-1})

L_n = priemerná lipidová frakcia (na základe vlhkej hmotnosti)

BCF_K = kinetický BCF (L kg^{-1})

LITERATÚRA

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. Kapitola C.20 tejto prílohy *Reprodukčný test na Daphnia magna*.

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. K dispozícii na webovej lokalite: 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

Dodatok 6

ODDIEL VENOVANÝ ROVNICIAM TÝKAJÚCIM SA TESTU ZAMERANÉHO NA EXPOZÍCIU PROSTREDNÍCTVOM VODNEJ FÁZY: MINIMALIZOVANÝ PLÁN TESTU

Dôvod tohto prístupu spočíva v tom, že v plnom teste možno biokoncentračný faktor stanoviť buď ako rovnovážny biokoncentračný faktor (BCF_{SS}) na základe výpočtu pomeru koncentrácie testovanej látky v tkanive ryby ku koncentrácii testovanej látky vo vode, alebo ho možno stanoviť na základe výpočtu kinetického biokoncentračného faktoru (BCF_K) ako pomer rýchlostnej konštanty vychytávania k_1 k rýchlostnej konštante depurácie k_2. BCF_K je platný aj vtedy, ak sa počas vychytávacej fázy nedosiahne rovnovážna koncentrácia látky za predpokladu, že vychytávanie a depurácia prebiehajú približne podľa kinetiky prvého rádu.

Ak sa meranie koncentrácie látky v tkanivách C_{f1}) uskutočňuje v čase, keď sa expozícia končí (t_1), a koncentrácia v tkanive (C_{f2}) sa opäť meria až po uplynutí istého obdobia (t_2), rýchlostnú konštantu depurácie (k_2) možno odhadnúť pomocou rovnice A5.22 uvedenej v dodatku 5.

Rýchlostnú konštantu vychytávania k_1 potom možno stanoviť algebricky pomocou rovnice A5.23 uvedenej v dodatku 5 (kde C_f sa rovná C_{f1} a t sa rovná t_1) (1). Kinetický biokoncentračný faktor v prípade minimalizovaného plánu testu (označený ako BCF_{Km} v záujme jeho odlíšenia od kinetických biokoncentračných faktorov stanovených pomocou iných metód) je teda:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[rovnica A6.1]}$$

Koncentrácie alebo výsledky by sa mali korigovať vzhľadom na riedenie látky vplyvom rastu ryby a normalizovať na 5 % obsah lipidov v rybe, ako sa opisuje v dodatku 5.

Minimalizovaný BCF_{SS} je BCF vypočítaný na konci fázy vychytávania za predpokladu dosiahnutia ustáleného stavu. Možno ho len predpokladať, pretože počet odberových bodov nepostačuje na jeho preukázanie.

$$\text{minimalizovaný } BCF_{SS} = \frac{C_{f-minSS}}{C_{w-minSS}} \qquad \text{[rovnica A6.2]}$$

kde

$C_{f\text{-}minSS}$ = koncentrácia v rybe pri predpokladanom ustálenom stave na konci vychytávania (mg · kg^{-1} vlhkej hmotnosti).

$C_{w\text{-}minSS}$ = koncentrácia vo vode pri predpokladanom ustálenom stave na konci vychytávania (mg · l^{-1}).

LITERATÚRA

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

Dodatok 7

ODDIEL VENOVANÝ ROVNICIAM TÝKAJÚCIM SA TESTU ZAMERANÉHO NA EXPOZÍCIU PROSTREDNÍCTVOM POTRAVY

1. Príklad množstiev jednotlivých zložiek vhodného komerčného krmiva pre ryby

2. Príklady postupov pridávania testovanej látky do potravy

3. Výpočet asimilačnej účinnosti a biomagnifikačného faktoru

4. Korekcia obsahu lipidov

5. Vyhodnotenie rozdielov medzi meranou koncentráciou v čase nula ($C_{0,m}$) a odvodenou koncentráciou v čase nula ($C_{0,d}$)

6. Usmernenia týkajúce sa testovaných látok s veľmi rýchlou depuráciou

1. PRÍKLAD MNOŽSTIEV JEDNOTLIVÝCH ZLOŽIEK VHODNÉHO KOMERČNÉHO KRMIVA PRE RYBY

hlavná zložka	rybia múčka
celkový obsah proteínu	≤ 55,0 %
celkový obsah tuku	≤ 15,0 % ([207])
celkový obsah vlákniny	≥ 2,0 %
vlhkosť	≥ 12 %
popol	≥ 8 %

([1]) Je možné, že v niektorých regiónoch sa dá získať len krmivo pre ryby s koncentráciu lipidov, ktorá zďaleka nedosahuje túto hornú hranicu. V takých prípadoch by sa v štúdii malo použiť krmivo v dodávanej forme, s nižšou koncentráciou lipidov, pričom by sa kŕmna dávka mala primerane upraviť s cieľom zachovať zdravie rýb. Obsah lipidov v potrave by sa nemal umelo zvyšovať pridávaním oleja.

2. PRÍKLADY POSTUPOV PRIDÁVANIA TESTOVANEJ LÁTKY DO POTRAVY

Všeobecné poznámky

Kontrolná potrava by sa mala pripravovať úplne rovnako ako potrava s pridanou testovanou chemikáliou, avšak bez testovanej látky.

Na kontrolu koncentrácie potravy s pridanou testovanou chemikáliou by sa mali pomocou vhodnej extrakčnej metódy vyextrahovať trojité vzorky dávkového krmiva, pričom by sa v extrahovaných vzorkách mala odmerať koncentrácia testovanej látky alebo rádioaktivita. Mala by sa preukázať vysoká analytická výťažnosť (> 85 %) s nízkou variabilitou medzi jednotlivými vzorkami (tri vzorky koncentrácie látky odobraté na začiatku testu by sa od priemernej hodnoty nemali líšiť o viac ako ± 15 %).

Počas testu s expozíciou prostredníctvom potravy by sa v deň 0 a na konci vychytávacej fázy mali na analýzu odobrať tri vzorky potravy na účely stanovenia obsahu testovanej látky v potrave.

Príprava krmiva pre ryby s (čistým) kvapalným testovaným materiálom

Cieľová nominálna testovacia koncentrácia v ovplyvnenom krmive pre ryby sa stanoví napríklad na 500 μg testovanej látky/g potravy. Príslušné množstvo (podľa molárnej hmotnosti alebo špecifickej rádioaktivity) čistej testovanej látky sa pridá ku krmivu pre ryby so známou hmotnosťou umiestnenému v sklenej nádobe alebo rotačnej odparke. Množstvo krmiva pre ryby by

▼M7

malo postačovať na celú vychytávaciu fázu (s prihliadnutím na potrebu zvýšených množstiev potravy pri každom kŕmení vzhľadom na rast rýb). Krmivo pre ryby by sa malo cez noc pomaly premiešavať s testovanou látkou (napr. v miešacom zariadení typu „roto-rack“ alebo rotáciou v prípade použitia rotačnej odparky). Potrava s pridanou testovanou chemikáliou by mala byť až do použitia uskladnená za podmienok, v ktorých sa zachová stabilita testovanej látky v kŕmnej zmesi (napr. v chladiacom zariadení).

Príprava krmiva pre ryby s kukuričným alebo rybím olejom ako nosičom

Tuhé testované látky by sa v trecej miske mali rozdrviť na jemný prášok. Kvapalné testované látky možno priamo pridať ku kukuričnému alebo rybiemu oleju. Testovaná látka sa rozpustí v známom množstve kukuričného alebo rybieho oleja (napr. 5 – 15 ml). Olej s príslušnou dávkou sa kvantitatívne prenesie do rotačnej odparky vhodnej veľkosti. Banka použitá na prípravu dávky uvedeného oleja by sa mala dvakrát vypláchnuť malým množstvom oleja, ktoré sa následne pridá do odparky s cieľom zabezpečiť prenos všetkej rozpustenej testovanej látky. V záujme úplného rozpustenia/rozptýlenia látky v oleji (alebo ak sa v štúdii používa viac ako jedna testovaná látka) sa do banky vloží mikromiešadlo, banka sa zazátkuje a zmes sa cez noc rýchlo mieša. Na účely testu sa do odparky pridá primerané množstvo krmiva pre ryby (zvyčajne vo forme peliet) a obsah banky sa homogénne mieša jej nepretržitým otáčaním v trvaní aspoň 30 minút, no pokiaľ možno cez noc. Na zabezpečenie stability testovanej látky v krmive s prídavkom testovanej chemikálie sa toto krmivo až do jeho použitia primerane uskladní (napríklad v chladiacom zariadení).

Príprava krmiva pre ryby s organickým rozpúšťadlom

Primerané množstvo testovanej látky (podľa molárnej hmotnosti alebo špecifickej rádioaktivity), ktoré postačuje na dosiahnutie cieľovej dávky, sa rozpustí vo vhodnom organickom rozpúšťadle (napríklad v 10 – 40 ml cyklohexánu alebo acetónu, ale prípadne aj vo väčšom objeme v závislosti od množstva potravy, do ktorej sa má pridať testovaná chemikália). Alikvotná časť tohto roztoku alebo celý roztok (pridáva sa po častiach) sa zmieša s primeraným množstvom krmiva pre ryby postačujúcim na to, aby sa v rámci testu dosiahla požadovaná nominálna úroveň dávky. Krmivo a testovanú látku možno zmiešať v zmiešavacej miske z nehrdzavejúcej ocele, následne možno čerstvo pripravenú dávku krmiva pre ryby v tejto miske dva dní ponechať v laboratórnom digestore (s občasným premiešaním), vďaka čomu sa z nej odparí nadbytočné rozpúšťadlo. Prípadne možno krmivo a testovanú látku zmiešať v rotačnej odparke s nepretržitou rotáciou. Nadbytočné rozpúšťadlo možno v prípade potreby odstrániť prúdom vzduchu alebo dusíkom. Treba dbať na to, aby testovaná látka po odstránení rozpúšťadla nevykryštalizovala. Potrava s pridanou testovanou chemikáliou by mala byť až do použitia uskladnená za podmienok, v ktorých sa zachová stabilita testovanej látky v kŕmnej zmesi (napr. v chladiacom zariadení).

3. VÝPOČET ASIMILAČNEJ ÚČINNOSTI A BIOMAGNIFIKAČNÉHO FAKTORA

Na výpočet asimilačnej účinnosti treba najprv odhadnúť celkovú rýchlostnú konštantu depurácie podľa dodatku 5 oddielu 4 (pomocou metódy postupného testovania, t. j. štandardnej lineárnej regresie) s použitím priemerných koncentrácií vzoriek získaných z depuračnej fázy. Rýchlostná konštanta kŕmenia – I a trvanie vychytávania – t sú v rámci tejto štúdie známe parametre. Priemerná nameraná koncentrácia testovanej látky prítomnej v potrave – C_{food} je v štúdii meranou premennou. Koncentrácia testovanej látky v rybách na konci vychytávacej fázy – $C_{0,\text{d}}$ sa obvykle odvodzuje z úseku graficky znázorneného priebehu prirodzeného logaritmu ln(koncentrácie) v závislosti od dňa depurácie.

Asimilačná účinnosť danej látky (a, absorpcia testovanej látky v črevách) sa vypočíta takto:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{food}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \qquad \text{[rovnica A7.1]}$$

kde

$C_{0,d}$ = odvodená koncentrácia látky v rybe v čase „nula“ depuračnej fázy (mg kg^{-1});

▼M7

k_2 = celková (vzhľadom na rast nekorigovaná) rýchlostná konštanta depurácie (deň$^{-1}$) vypočítaná podľa rovníc uvedených v dodatku 5 oddiele 3;

I = rýchlostná konštanta požitia potravy (g potravy g^{-1} ryby deň$^{-1}$);

C_{food} = koncentrácia v potrave (mg kg^{-1} potravy);

t = trvanie obdobia kŕmenia (deň)

V záujme stanovenia presnej asimilačnej účinnosti bude však treba upraviť rýchlosť kŕmenia I, ktorá sa používa pri výpočte, vzhľadom na rast rýba. Ak v rámci testu počas vychytávacej fázy (v rámci ktorej nedôjde k žiadnej úprave krmivových dávok s cieľom zachovať nastavenú mieru kŕmenia) dochádza k výraznému rastu rýb, vzhľadom na pokračujúcu fázu vychytávania bude efektívna miera kŕmenia v porovnaní s nastavenou mierou nižšia, čo povedie k vyššej „skutočnej“ asimilačnej účinnosti. (Poznamenávame, že táto skutočnosť nemá význam pre celkový výpočet BMF, keďže veličina I sa použitím rovníc A7.1 a A7.4 fakticky vykráti). Priemernú rýchlosť kŕmenia korigovanú vzhľadom na riedenie látky vplyvom rastu – I_g možno odvodiť niekoľkými spôsobmi. Priamočiara a striktná metóda spočíva v uplatnení známej rýchlostnej konštanty rastu (k_g) na odhadnutie hmotnosti testovaných rýb v časových bodoch počas vychytávacej fázy, t. j.:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \qquad \text{[rovnica A7.2]}$$

kde

W_f (t) = priemerná hmotnosť rýb v deň t vychytávania

$W_{f,0}$ = priemerná hmotnosť rýb na začiatku experimentu

Týmto spôsobom možno odhadnúť (aspoň) priemernú hmotnosť rýb v posledný deň expozície ($W_{f,end\text{-}of\text{-}uptake}$). Keďže rýchlosť kŕmenia vychádza z $W_{f,0}$,efektívnu rýchlosť kŕmenia na každý deň vychytávania možno vypočítať pomocou týchto dvoch hmotnostných hodnôt. V prípade rýchleho rastu počas vychytávacej fázy treba namiesto veličiny I uplatniť rýchlosť kŕmenia korigovanú vzhľadom na rast, a to I_g (g potravy g^{-1} ra rybu na deň $^{-1}$), ktorú možno vypočítať takto:

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,end\text{-}of\text{-}uptake}} \qquad \text{[rovnica A7.3]}$$

Po vypočítaní/vyjadrení asimilačnej účinnosti možno BMF vypočítať vynásobením asimilačnej účinnosti rýchlostnou konštantou kŕmenia I (alebo I_g, ak sa použila na výpočet α) a následným vydelením výsledku celkovou rýchlostnou konštantou depurácie k_2:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_2} \qquad \text{[rovnica A7.4]}$$

Rovnakým spôsobom by sa mal vypočítať biomagnifikačný faktor korigovaný vzhľadom na rast, a to pomocou rýchlostnej konštanty depurácie korigovanej vzhľadom na rast (na základe jej odvodenia uvedeného v dodatku 5 oddiele 7). Opäť uvádzame, že ak sa na výpočet α použila veličina I_g, mala by sa použiť aj tu namiesto I:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \qquad \text{[rovnica A7.5]}$$

kde:

α = asimilačná účinnosť (absorpcia testovanej látky v črevách);

k_2 = celková (vzhľadom na rast nekorigovaná) rýchlostná konštanta depurácie (deň$^{-1}$) vypočítaná podľa rovníc uvedených v dodatku 5 oddiele 3;

▼M7

k_{2g} = rýchlostná konštanta depurácie korigovaná vzhľadom na rast (deň $^{-1}$);

I = rýchlostná konštanta požitia potravy (g potravy g^{-1} ryby deň$^{-1}$);

Polčas rozpadu korigovaný vzhľadom na rast ($t_{1/2}$) sa vypočíta takto:

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{k_{2g}} \quad \text{[rovnica A7.6]}$$

Odhadnúť možno aj asimilačnú účinnosť látky obsiahnutej v potrave, ak sa počas lineárnej fázy vychytávania (v dňoch 1 až 3) stanovia rezíduá látky v tkanivách. V tomto prípade sa asimilačná účinnosť látky (α) určí takto:

$$\alpha = \frac{C_{fish}(t)}{I \times C_{food} \times t} \quad \text{[rovnica A7.7]}$$

kde

C_{fish} (t) = koncentrácia testovanej látky v rybe v čase t (mg kg^{-1} vlhkej hmotnosti)

4. KOREKCIA OBSAHU LIPIDOV

Ak sa meranie obsahu lipidov uskutočnilo na tej istej rybe, na ktorej sa vykonala chemická analýza vo všetkých intervaloch odberu vzoriek, potom by sa jednotlivé koncentrácie mali korigovať na základe lipidov, pričom by sa veličiny $C_{0,\text{d}}$ a k_2 získali z grafického znázornenia prirodzeného logaritmu koncentrácie korigovanej vzhľadom na obsah lipidov v závislosti od depurácie (v dňoch). Asimilačnú účinnosť (rovnica A7.1) potom možno vypočítať na základe lipidov, a to pomocou C_{food} na základe lipidov (t. j. hodnota C_{food} sa vynásobí priemernou frakciou lipidov danej potravy). Z následného výpočtu s použitím rovnice A7.4 a rovnice A7.5 priamo vyplynie BMF korigovaný vzhľadom na obsah lipidov (a korigovaný vzhľadom na riedenie látky vplyvom rastu).

V opačnom prípade sa priemer frakcie lipidov (hmotnostný zlomok) obsiahnutých v rybách a potrave vypočítajú v prípade ovplyvňovanej, ako aj kontrolnej skupiny (pokiaľ ide o potravu a ryby v kontrolnej skupine, zvyčajne ide o údaje namerané na začiatku a na konci expozície; pokiaľ ide o ryby v ovplyvňovanej skupine, zvyčajne ide o údaje namerané len na konci expozície). V niektorých štúdiách sa obsah lipidov v rybách môže výrazne zvýšiť. V takýchto prípadoch je vhodnejšie použiť priemernú koncentráciu lipidov v ovplyvňovaných rybách, ktorá sa vypočíta na základe nameraných hodnôt na konci expozície a na konci depurácie. Vo všeobecnosti by sa na odvodenie oboch frakcií lipidov mali použiť len údaje z ovplyvňovanej skupiny.

Faktor korekcie vzhľadom na lipidy (L_c) sa vypočíta takto:

$$Lc_C = \frac{L_{fish}}{L_{food}} \quad \text{[rovnica A7.8]}$$

kde L_{fish} je priemerná frakcia lipidov v rybách a L_{food} je priemerná frakcia lipidov v potrave.

Faktor korekcie vzhľadom na lipidy sa použije na výpočet biomagnifikačného faktora korigovaného vzhľadom na obsah lipidov (BMF_L):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C} \quad \text{[rovnica A7.9]}$$

5. VYHODNOTENIE ROZDIELOV MEDZI MERANOU KONCENTRÁCIOU V ČASE NULA ($C_{0,\text{M}}$) A ODVODENOU KONCENTRÁCIOU V ČASE NULA ($C_{0,\text{D}}$)

Meraná koncentrácia v čase nula ($C_{0,\text{m}}$) a odvodená koncentrácia v čase nula ($C_{0,\text{d}}$) by sa mali porovnať. Ak sú veľmi podobné, potom by sa na odvodenie depuračných parametrov mal použiť model prvého rádu.

▼M7

V niektorých štúdiách môžu existovať výrazné rozdiely medzi $C_{0,d}$, teda odvodenou hodnotou v čase nula, a priemernou meranou koncentráciou v čase nula. $C_{0,m}$ (pozri poslednú zarážku bodu 159 tejto testovacej metódy). Ak je hodnota $C_{0,d}$ oveľa nižšia ako hodnota $C_{0,m}$ ($C_{0,d} << C_{0,m}$), z rozdielu môže vyplývať, že v črevách sú prítomné zvyšky nestrávenej potravy s pridanou testovanou chemikáliou. Ak sa na konci vychytávacej fázy odobrali a uskladnili ďalšie vzorky (celé ryby), túto skutočnosť možno experimentálne otestovať vykonaním samostatnej analýzy odstráneného čreva. V opačnom prípade, ak zo štatisticky reprezentatívneho testu na odľahlé hodnoty použitého na lineárnu regresiu depuračnej fázy vyplýva, že hodnota v prvom bode odberu vzorky v depuračnej fáze je chybne zvýšená, bude potenciálne vhodné uskutočniť lineárnu regresiu na odvodenie k_2, avšak s vynechaním prvej depuračnej koncentrácie. V takýchto prípadoch, ak dôjde k značnému zníženiu neistoty lineárnej regresie a je zrejmé, že pre kinetiku v depuračnej fáze v zásade platí kinetika prvého rádu, pri výpočte asimilačnej účinnosti bude možno vhodné použiť výsledné hodnoty $C_{0,d}$ a k_2. Pri uvádzaní výsledkov by sa mala táto skutočnosť plne odôvodniť. Okrem toho je možné, že v rámci depuračnej fázy fungovala kinetika iného ako prvého rádu. Ak je táto situácia pravdepodobná (t. j. je zjavné, že údaje transformované prostredníctvom prirodzeného logaritmu predstavujú krivku v porovnaní s priamkou v grafe lineárnej regresie), potom je nepravdepodobné, že výpočty k_2 a $C_{0,d}$ budú platné, a teda sa treba poradiť s odborníkom v oblasti bioštatistiky.

Ak je hodnota $C_{0,d}$ oveľa vyššia ako nameraná hodnota ($C_{0,d} >> C_{0,m}$), môže to znamenať, že: v prípade danej látky došlo k veľmi rýchlej depurácii (t. j. v depuračnej fáze sa body odberu veľmi skoro priblížili k limitu kvantifikácie predmetnej analytickej metódy, pozri oddiel 6); došlo k odchýlke od depuračnej kinetiky prvého rádu; došlo k chybe v lineárnej regresii na odvodenie k_2 a $C_{0,d}$; alebo že v rámci štúdie došlo k výskytu problému týkajúceho sa meraných koncentrácií v istých časových bodoch odberu vzoriek. V takýchto prípadoch by sa mal preskúmať graf lineárnej regresie s cieľom zaznamenať vzorky v limite kvantifikácie alebo v jeho blízkosti, a to na účely zistenia extrémnych odľahlých hodnôt alebo zjavného zakrivenia (čo naznačuje kinetiku iného ako prvého rádu), a tieto skutočnosti by sa mali zdôrazniť pri uvádzaní výsledkov. Malo by sa opísať a odôvodniť každé následné prehodnotenie lineárnej regresie zamerané na zlepšenie odhadovaných hodnôt. Ak sa spozorujú značné odchýlky od kinetiky prvého rádu, potom je nepravdepodobné, že výpočty k_2 a $C_{0,d}$ budú platné, a teda sa treba poradiť s odborníkom v oblasti bioštatistiky.

6. USMERNENIA TÝKAJÚCE SA TESTOVANÝCH LÁTOK S VEĽMI RÝCHLOU DEPURÁCIOU

Ako sa uvádza v bode 129 testovacej metódy, niektoré látky sa môžu depurovať tak rýchlo, že nemožno dospieť k spoľahlivej koncentrácii v čase nula – $C_{0,d}$ ani k hodnote k_2, pretože už ani vo vzorkách odobratých veľmi skoro v depuračnej fáze (t. j. počnúc druhou depuračnou vzorkou) sa daná látka viac fakticky nedá namerať (koncentrácie zaznamenané v limite kvantifikácie). Táto situácia bola zaznamenaná počas medzilaboratórnej porovnávacej skúšky vykonanej na podporu tejto testovacej metódy s benzo[a]pyrénom a je zdokumentovaná vo validačnej správe k tejto metóde. V takýchto prípadoch nemožno lineárnu regresiu spoľahlivo uskutočniť, keďže z nej pravdepodobne vyplynie nerealisticky vysoký odhad $C_{0,d}$, v dôsledku čoho dôjde k zdanlivej asimilačnej účinnosti, ktorá je výrazne vyššia ako 1. V takýchto prípadoch sa dá vypočítať konzervatívny odhad k_2 a „horná medza“ BMF.

Pomocou uvedených dátových bodov depuračnej fázy, kde sa merala koncentrácia až po prvú nedetegovateľnú koncentráciu a vrátane nej (koncentrácia stanovená v limite kvantifikácie), sa pomocou lineárnej regresie (s použitím údajov o koncentrácii transformovaných prostredníctvom prirodzeného logaritmu v závislosti od času) bude dať odhadnúť hodnota k_2. V takýchto prípadoch sa pravdepodobne vyskytnú iba dva dátové body (napr. odbery v dni 1 a 2 depurácie) a následne možno pomocou rovnice A5.22 uvedenej v dodatku 5 odhadnúť hodnotu k_2. Tento odhad k_2 možno použiť na odhad

▼M7

asimilačnej účinnosti podľa rovnice A7.1, pričom sa v prípade, že hodnota $C_{0,d}$ je podľa odhadu zjavne oveľa vyššia, než aká by sa dala dosiahnuť v teste, hodnota $C_{0,d}$ sa v rovnici nahradí meranou koncentráciou v čase nula ($C_{0,m}$). Ak hodnota $C_{0,m}$ nebola merateľná, mal by sa použiť limit detekcie v tkanive ryby. Ak z toho v niektorých prípadoch vyplýva hodnota $\alpha > 1$, potom sa v prípade „najhoršieho scenára“ predpokladá, že hodnota asimilačnej účinnosti je 1.

Pomocou rovnice A7.4 možno potom odhadnúť maximálny BMF_K, ktorý by sa mal označiť ako hodnota „oveľa menej než“ (<<). Napríklad v prípade štúdie s mierou kŕmenia 3 % a depuračným polčasom kratším ako 3 dni a s uplatnením „najhoršieho scenára“, v rámci ktorého sa α rovná 1, je pravdepodobné, že BMF_K bude nižší ako asi 0,13. Vzhľadom na účel tohto odhadu, ako aj na skutočnosť, že hodnoty budú mať konzervatívny charakter, ich nie je potrebné korigovať vzhľadom na riedenie látky vplyvom rastu ryby ani na obsah lipidov v rybách a potrave.

▼M7

Dodatok 8

PRÍSTUPY ODHADOVANIA ORIENTAČNÝCH BCF NA ZÁKLADE ÚDAJOV ZÍSKANÝCH V ŠTÚDII ZAMERANEJ NA EXPOZÍCIU PROSTREDNÍCTVOM POTRAVY

Metóda s expozíciou prostredníctvom potravy je súčasťou tejto testovacej metódy zameranej na testovanie bioakumulácie látok, ktoré v praxi nemožno testovať pomocou metódy, v ktorej sa využíva expozícia prostredníctvom vodného prostredia. Výsledkom metódy na báze expozície prostredníctvom vodného prostredia je biokoncentračný faktor, kým metóda na báze expozície prostredníctvom potravy zase vedie priamo k informáciám o magnifikačnom potenciáli krmiva. V mnohých systémoch chemickej bezpečnosti sa vyžadujú informácie o vodnej biokoncentrácii (napríklad v súvislosti s posudzovaním rizika či globálnym harmonizovaným systémom klasifikácie). Existuje teda potreba využiť údaje získané v rámci štúdie týkajúcej sa expozície prostredníctvom potravy na účely odhadu biokoncentračného faktora. Daný prístup je porovnateľný s testami vykonanými podľa metódy expozície prostredníctvom vodného prostredia ([1]). V tomto oddiele sa skúmajú možné prístupy na riešenie nastoleného problému, no uvádzajú sa v ňom aj nedostatky spočívajúce v predmetných odhadoch.

V predmetnej štúdii zameranej na expozíciu prostredníctvom potravy sa meria depurácia s cieľom zistiť rýchlostnú konštantu depurácie k_2. Ak na základe dostupných údajov o situácii, keď boli ryby vystavené testovanej látke prostredníctvom vodného prostredia, možno odhadnúť rýchlostnú konštantu vychytávania, potom kinetický BCF možno odhadnúť.

Odhad rýchlostnej konštanty vychytávania pri expozícii testovanej látke prostredníctvom vodného prostredia závisí od viacerých predpokladov, z ktorých všetky prispejú k neistote daného odhadu. Okrem toho sa pri tomto prístupe k odhadu BCF predpokladá, že celková rýchlosť depurácie (vrátane ovplyvňujúcich faktorov, medzi ktoré patrí napríklad distribúcia látky v organizme a individuálne depuračné procesy) nezávisí od spôsobu expozície, ktorý sa uplatňuje so zámerom vyvolať záťaž organizmu v dôsledku pôsobenia testovanej látky.

Hlavné predpoklady obsiahnuté v odhadovacom prístupe možno zhrnúť takto:

V prípade konkrétnej látky je depurácia nasledujúca po vychytávaní prostredníctvom potravy rovnaká ako depurácia, ktorá nasleduje po expozícii prostredníctvom vodného prostredia.

Vychytávanie z vodného prostredia by sa riadilo kinetikou prvého rádu.

V závislosti od metódy použitej na odhad vychytávania:

— vychytávanie závisí len hmotnosti rýb;

— vychytávanie závisí len od rozdeľovacej konštanty oktanol-voda danej látky;

— vychytávanie závisí od kombinácie hmotnosti rýb a rozdeľovacej konštanty oktanol-voda danej látky;

— len malý vplyv majú faktory, ktoré môžu v praxi ovplyvniť vychytávanie v rámci štúdie zameranej na expozíciu vo vodnom prostredí, ako biodostupnosť látky, adsorpcia na prístroj, molekulárna veľkosť atď.;

— no predovšetkým:

databáza („cvičný súbor“) používaná pri vývoji metódy odhadu vychytávania má v prípade látky, ktorá je predmetom posudzovania, reprezentatívny charakter.

V niekoľkých dostupných literárnych prameňoch sa uvádzajú príklady odvodenia rovníc, v ktorých existuje vzťah medzi vychytávaním látky z vodného prostredia žiabrami rýb a rozdeľovacou konštantou oktanol–voda, hmotnosťou rýb (1) (2) (3) (4), objemom a/alebo obsahom lipidov, priepustnosťou membrány/difúznosťou 5) 6), ventilačným objemom ryby (7) a posudzovaním fugacity/materiálovej bilancie (8) (9) (10). Podrobné posúdenie týchto metód v danom kontexte

([1]) Pokiaľ ide o veľmi hydrofóbne látky, je pravdepodobné, že vo voľnej prírode dochádza k najzávažnejším expozíciám vo vodnom prostredí najmä v dôsledku ich požitia. Preto odhad BCF striktne nereprezentuje bioakumulačný potenciál takejto látky.

▼M7

sa uvádza v publikácii od autorskej dvojice Crookes a Brooke (11). V tejto súvislosti je užitočnou pomôckou aj Barberova publikácia (12) zameraná na modelovanie bioakumulácie na základe vychytávania prostredníctvom potravy, pretože obsahuje údaje vychádzajúce z modelov zameraných na rýchlosť vychytávania testovanej látky žiabrami. Tomuto aspektu bol venovaný aj oddiel sprievodného informačného dokumentu k protokolu o expozícii prostredníctvom potravy z roku 2004 (13).

Zdá sa, že pri odvodzovaní týchto modelov sa využívali do istej miery obmedzené databázy. V prípade modelov, pri ktorých sú k dispozícii podrobnosti o databáze použitej pri ich zostavení, je zrejmé, že typy použitých látok majú často podobnú štruktúru alebo triedu (z hľadiska funkčnosti, napr. organochlórové zlúčeniny). Z toho popri zvažovaní takých špecifických testovacích parametrov, ako napríklad konkrétny druh, teplota atď, pramení ďalšia neistota v súvislosti s používaním modelu na účely predpovede rýchlostnej konštanty vychytávania pri inom druhu látky.

V preskúmaní dostupných techník (11) zarezonovala skutočnosť, že žiadna metóda nie je „správnejšia“ ako iné. Preto by sa malo jasne odôvodniť použitie konkrétneho modelu. Ak je k dispozícii niekoľko metód, ktorých použitie možno odôvodniť, bolo by rozumné predložiť niekoľko odhadov k_1 (a tak aj BCF) alebo škály hodnôt k_1 (a BCF) podľa viacerých metód odhadu vychytávania. Vzhľadom na rozdiely v druhoch modelov a súboroch údajov, ktoré sa použili pri ich vypracovaná, by však nebolo vhodné uplatniť priemernú hodnotu získanú na základe rôznorodo odvodených odhadov.

Podľa názoru niektorých výskumníkov si takýto druh odhadov BCF vyžaduje korekciu biologickej dostupnosti v záujme zohľadnenia adsorpcie látky na rozpustený organický uhlík (DOC) za podmienok expozície prostredníctvom vodného prostredia, aby sa odhad zosúladil s výsledkami štúdií venovaných expozícii vo vodnom prostredí [napr. (13) (14)]. Táto korekcia však nemusí byť vhodná vzhľadom na nízke úrovne DOC, ktoré sa vyžadujú v prípade odhadu „najhoršieho scenára“ v rámci štúdie expozície prostredníctvom vodného prostredia (t. j. pomer biologicky dostupnej látky a látky meranej v roztoku). V prípade vysokohydrofóbnych látok môže dôjsť k obmedzeniu vychytávania v žiabrach v dôsledku miery pasívnej difúzie v blízkosti povrchu žiabier. V takomto prípade je možné, že korekciou sa zohľadňuje tento účinok, a nie ten, na ktorý bola určená.

Odporúčame zamerať sa na metódy, ktoré si vyžadujú vstupy, pri ktorých možno okamžite získať údaje o látkach testovaných podľa tu opísanej štúdie expozície prostredníctvom potravy (t. j. log K_{OW}, hmotnosť ryby). Uplatniť sa dajú aj iné metódy, ktoré si vyžadujú zložitejšie vstupy, no je možné, že pri nich budú potrebné ďalšie testovacie merania alebo podrobné znalostí o testovanej látke alebo druhu rýb, a tie možno nebudú všeobecne k dispozícii. Výber modelu môže okrem toho ovplyvniť aj úroveň validácie a oblasť uplatniteľnosti [na účely preskúmania a porovnania rôznych metód pozri (11)].

Treba mať na mysli, že výsledné odhady k_1 a BCF sú neisté, a teda je možné, že sa k nim bude musieť pristupovať na základe analýzy váhy dôkazov, pričom bude v záujme celkového vnímania bioakumulačného potenciálu látky potrebné uplatniť odvodený BMF a parametre danej látky (napr. veľkosť molekúl). Interpretácia a použitie týchto parametrov môže závisieť od regulačného rámca.

LITERATÚRA

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. **RASTOVÝ TEST MLÁĎAT RÝB**

1. **METÓDA**

Táto testovacia metóda vplyvu toxicity na rast rýb je totožná s metódou OECD TG 215 (2000).

1.1. ÚVOD

Tento test je určený na odhadnutie účinkov predĺženého pôsobenia chemických látok na rast mláďat rýb. Vychádza z metódy, ktorá bola vyvinutá a podrobená skupinovým testom (1) (2) v rámci Európskej únie, používa sa na odhadnutie účinkov chemických látok na rast mláďat pstruha dúhového *(Oncorynchus mykiss)* za prietočných podmienok. Môžu sa použiť aj iné dobre zdokumentované druhy. K dispozícii sú napríklad skúsenosti z rastových testov pre zebričky *(Danio rerio)* ([1]) (3), (4) a ryžové rybky ((medaka, *Oryzias latipes)* (6) (7) (8).

Pozri všeobecný úvod časť C.

1.2. DEFINÍCIE

Najnižšia zistená účinná koncentrácia (LOEC): je najnižšia testovaná koncentrácia látky, pri ktorej je pozorované, že má významný účinok ($p < 0,05$) v porovnaní s kontrolou. Všetky skúšobné koncentrácie vyššie ako LOEC musia mať škodlivé účinky rovnaké alebo vyššie než účinky pozorované pri LOEC.

Nezistená účinná koncentrácia (NOEC): je testovaná koncentrácia hneď pod LOEC.

EC_x: v tejto skúšobnej metóde je to koncentrácia testovanej látky, ktorá spôsobila x % zmenu v raste rýb, ak sa porovnajú s kontrolnou skupinou.

Nasadené množstvo: je mokrá hmotnosť rýb na objem vody.

Chovná hustota: je počet rýb na objem vody.

Špecifická rastová miera individuálnej ryby: vyjadruje mieru rastu jedného indivídua, založenú na jeho počiatočnej hmotnosti.

Priemerná špecifická rastová miera v nádrži: vyjadruje význam miery rastu pre populáciu v nádrži pri jednej koncentrácií.

Pseudošpecifická miera rastu: vyjadruje individuálnu mieru rastu porovnaním s počiatočnou hmotnosťou populácie v nádrži.

([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. 231 – 236.

▼B

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Mláďatá rýb v exponenciálnej fáze rastu sa po ich zvážení umiestnia do testovacích komôr a sú vystavené účinkom testovanej látky, rozpustenej vo vode v rôznych subletálnych koncentráciách, najlepšie pri prietočných podmienkach, alebo ak to nie je možné, pri vhodných semistatických podmienkach. Doba testu je 28 dní. Ryby sa kŕmia denne. Dávka potravy závisí od počiatočnej hmotnosti ryby a prepočítava sa po 14-tich dňoch. Na konci testu sa ryby odvážia znovu. Vplyvy na mieru rastu sa analyzujú použitím regresného modelu, aby sa odhadla koncentrácia, ktorá môže spôsobiť x-percentnú odchýlku v miere rastu, t. j. EC_x (napr. EC_{10}, EC_{20} alebo EC_{30}). Údaje sa môžu porovnať s kontrolnými hodnotami, a tým sa stanoví najnižšia zistená efektívna koncentrácia (LOEC) a odtiaľ nezistená efektívna (účinná) koncentrácia (NOEC).

1.4. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LATKE

Výsledky testov akútnej toxicity (pozri testovaciu metódu C.1.) prevedených najlepšie s druhmi vybratými na tento test by mali byť dostupné. Z toho vyplýva, že rozpustnosť vo vode a tlak pár testovanej látky je známy a že je dostupná spoľahlivá analytická metóda na kvantitatívne stanovenie testovanej látky v testovanom roztoku a tiež sa dá stanoviť rozpätie údajov o presnosti.

Užitočné sú informácie ako štruktúrny vzorec, čistota látky, stabilita vo vode a na svetle pK_a (disociačná konštanta), P_{ow} (rozdeľovaci koeficient v systéme oktanol-voda), výsledky z testov biodegradability (pozri testovacia metóda C.4.).

1.5. PLATNOSŤ TESTOVACEJ METÓDY

Pre platnosť testu je potrebné uplatňovať nasledujúce podmienky:

— mortalita v kontrolných skupinách nesmie presiahnuť 10 % na konci testu,

— hmotnosť rýb v kontrolnej skupine musí dostatočne narásť, aby umožnila detekcie minimálnej odchýlky v miere rastu, ktorá je považovaná za významnú. Kruhový test (2) ukázal, že pre dúhového pstruha musí hmotnosť v kontrolnej vzorke vzrásť najmenej o polovicu (t. j. 50 %) z ich počiatočnej hmotnosti za 28 dní napr. počiatočná hmotnosť 1g/ryba (= 100 %), konečná hmotnosť po 28 dňoch: > 1,5 g/ryba (> 150 %),

— koncentrácia rozpusteného kyslíka musí byť najmenej 60 % saturačnej hodnoty vzduchom (ASV) počas testu,

— teplota vody sa môže líšiť nie viac ako ± 1 °C medzi testovacími komorami v danom čase testu a mala by byť udržiavaná v rozsahu 2 °C v teplotných rozsahoch špecifikovaných pre testovaný druh (dodatok 1).

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. **Zariadenie**

Obvyklé laboratórne vybavenie a nasledujúce špeciálne zariadenie:

— zariadenie na meranie kyslíka a pH meter,

▼B

— zariadenie na stanovenie tvrdosti vody a alkality,

— vhodné prístroje na kontrolu teploty a kontinuálne monitorovanie,

— nádrže z chemicky inertných materiálov a vhodnej kapacity v súvislosti na odporučenú násadu a sieťovú hustotu (pozri odsek 1.8.5. a dodatok 1),

— vhodné presné váhy (t. j. presnosť do ± 0,5 %).

1.6.2. **Voda**

Použiteľná voda na test je každá voda, v ktorej testovaný druh vykazuje vhodné dlhotrvajúce prežívanie a rast. Musí mať konštantnú kvalitu počas celého testu. pH vody má byť v rozsahu od 6,5 do 8,5, ale počas daného testu môže byť v rozsahu ± 0,5 pH jednotky. Odporučená tvrdosť vody je 140 mg/l (ako $CaCO_3$). Aby sa zaistilo, že voda používaná ako rozpúšťadlo nebude mať prílišný vplyv na výsledky testu (napr. tvorbu komplexu testovanej látky), vzorky sa odoberajú v intervaloch počas analýzy. Ak je známe, že voda má relatívne konštantnú kvalitu, zistenie ťažkých kovov (napr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd a Ni), hlavných aniónov a katiónov (napr. Ca, Mg, Na, K, Cl a SO_4), pesticídov (napr. celkové organofosforečné a organochlórové pesticídy) celkového organického uhlíka, suspendovaných látok sa vykonáva napr. každé tri mesiace. Ak sa potvrdilo, že kvalita vody je stabilná najmenej počas jedného roka, zistenia sa nemusia vykonávať tak často a intervaly medzi nimi sa môžu predĺžiť (napr. každý šiesty mesiac). Niektoré chemické vlastnosti pre vodu určenú na rozpúšťanie sú v zozname v dodatku 2.

1.6.3. **Testované roztoky**

Testovacie roztoky vybraných koncentrácií sa pripravia riedením zásobného roztoku.

Zásobný roztok má byť pripravený jednoduchým miešaním alebo trepaním testovanej látky v riediacej vode mechanickým prostriedkom (napr. miešaním alebo ultrazvukom). Nasycovanie kolón sa môže využiť na docielenie vhodne koncentrovaných zásobných roztokov.

Použitie rozpúšťadiel alebo látok zlepšujúcich rozpustnosť sa môže vyžadovať v niektorých prípadoch, aby sa zabezpečila príprava vhodne koncentrovaných zásobných roztokov. Vhodnými rozpúšťadlami sú napr. acetón, etanol, metanol, dimetyl sulfoxid, dimetylformamid a trityléngly kol. Príklady vhodných dispergentov sú Cremophor RH 40, Tween 80, Methylcellulose 0,01 % a HCO-40. Ak sa používajú ľahko biodegradovateľné reagenty (napr. acetón) a/alebo vysoko prchavé zlúčeniny, tieto môžu spôsobiť problémy v stavbe baktérií v prietočných testoch. Ak sa použijú látky zvyšujúce rozpustnosť, nesmú mať žiadny signifikantný účinok na rast rýb alebo viditeľné škodlivé účinky na mláďatá, ako by sa preukázali iba pri kontrole rozpúšťadla (napr. meracia pumpa, proporcionálny zmiešavač, saturačný systém).

▼B

Na prietočné testy sa vyžaduje systém, ktorý kontinuálne rozdeľuje zásobný roztok testovanej látky a dodáva ho do testovacích komôr. Prietoky zásobných roztokov a vody na riedenie sa kontrolujú v časových intervaloch, najlepšie denne počas trvania testu a nesmú sa meniť viac ako 10 %. Kruhový test (2) preukázal, že pre pstruha dúhového je postačujúca frekvencia výmeny vody počas testu 6 litrov/g hmotnosti ryby/deň (pozri odsek 1.8.2.2.).

Pre semi-statické testy bude frekvencia výmeny prostredia závisieť od stability testovanej látky, ale odporúča sa denne vymieňať vodu. Ak predbežný test stability preukázal, že koncentrácia testovanej látky nie je stabilná počas periódy obnovy (t. j. je mimo rozsahu 80 – 120 % nominálnej koncentrácie alebo pod 80 % nameranej počiatočnej koncentrácie), je treba vziať do úvahy použitie prietočného testu.

1.6.4. **Výber druhov**

Pstruh dúhový *(Oncorhynchus mykiss)* je odporúčaným druhom na tento test odvtedy, čo sa v skupinových testoch získalo dostatočné množstvo skúseností s týmto druhom (1), (2). Môžu sa však použiť aj iné zdokumentované druhy, ale postupy pri testovaní sa musia prispôsobiť tak, aby sa dosiahli vyhovujúce podmienky testu napr. aj pre zebričku *(Danio rerio)* (3), (4) a ryžovú rybku *(Oryzias latipes)* (5), (6), (7) sú tieto skúsenosti dostatočné. Je potrebné uviesť odôvodnenie na výber druhov rýb a na výber experimentálnej metódy.

1.6.5. **Chov rýb**

Testované ryby sa budú vyberať z populácie jednej zásoby, najlepšie z rovnakého poteru (ikier), ktorý bol držaný najmenej dva týždne pred testom v podobných podmienkach vody a osvetlenia. Musia byť kŕmené dávkou potravy, ktorá sa rovná minimálne 2 % z telesnej hmotnosti ryby na deň a optimálna dávka vo výške 4 % z telesnej hmotnosti ryby na deň v období skladovania a počas testu.

V nasledujúcom 48-hodinovom nastavovacom období je zaznamenávaná mortalita a uplatňujú sa nasledujúce kritériá:

— mortalita vyššia ako 10 % populácie po siedmich dňoch, zamietne sa celá vsádka,

— mortalita medzi 5 % a 10 % z populácie, aklimatizácia ďalších sedem dní, ak je mortalita viac ako 5 % počas druhých siedmich dní, zamietne sa celá vsádka,

— mortalita je menej ako 5 % z populácie po siedmich dňoch, vsádka sa akceptuje.

Ryby nemajú byť vystavené chorobám počas dvoch týždňov predchádzajúcich testu alebo počas testu.

▼B

1.7. KONCEPCIA TESTU

Koncepcia testu sa vzťahuje na výber počtu a odstup testovaných koncentrácií, počet nádrží v každej koncentračnej hladine a počet rýb v každej nádrži. Ideálne je vyberať koncepciu s ohľadom na:

— objekt štúdie,

— metódu štatistickej analýzy, ktorá bude použitá,

— dostupnosť a cenu experimantálnych zdrojov.

Ak je to možné, stav objektu by mal špecifikovať štatistickú váhu, kde daná veľkosť diferencie (napr. miera rastu) a detekcia sa vyžaduje alebo alternatívne sa vyžaduje odhad EC_x (napr. s x = 10, 20 alebo 30, najlepšie na menej ako 10). Bez toho nemôže byť daný nemenný predpis o veľkosti štúdie.

Je dôležité vziať na vedomie, že usporiadanie, ktoré je optimálne (najlepšie využíva prostriedky) pri použití jednej metódy štatistickej analýzy, nie je nutne optimálne pre inú metódu. Doporučené usporiadanie pre odhad LOEC/NOEC teda nebýva rovnaké ako usporiadanie pre analýzu regresií.

V mnohých prípadoch sa regresnej analýze dáva prednosť pred analýzou rozptylu, a to z dôvodov diskutovaných Stephanom a Rogersom (8). Ak sa však nenájde vhodný regresný model (r^2 < 0,9), malo by sa použiť stanovenie NOEC/LOEC.

1.7.1. **Koncepcia regresnej analýzy**

Dôležité predpoklady na koncepciu regresnej analýzy sú:

— Učinná koncentrácia (napr. $EC_{10,\ 20,\ 30}$) a koncentračný rozsah testovanej látky, v ktorom nás zaujímajú jej účinky, a ktoré sa merajú koncentráciami zahrnutými do testu. Ak je efektívna koncentrácia v strede rozsahu testovaných koncentrácií, potom bude presnosť, s ktorou budú vykonané odhady účinných koncentrácií, najvyššia. Pri výbere vhodných testovacích koncentrácií môže byť nápomocný predbežný test na zistenie rozsahu.

— Aby sa umožnilo uspokojivé štatistické vytvorenie modelu, test by mal zahŕňať najmenej jednu kontrolnú nádrž a päť ďalších nádrží pri rôznych koncentráciách. Ak sa použila látka, ktorá zvyšuje rozpustnosť, okrem testovaných sérií je potrebné otestovať jednu kontrolnú nádrž, obsahujúcu látku zvyšujúcu rozpustnosť v najvyššej testovanej koncentrácii, ak je to možné (pozri odsek 1.8.3 a 1.8.4).

— Je potrebné použiť vhodné geometrické alebo logaritmické rady (9) (pozri dodatok 3). Preferuje sa logaritmický odstup medzi testovanými koncentráciami.

▼B

— Ak je k dispozícii viac ako 6 nádrží, každá z nich by mala byť použitá, aby sa získali opakovania alebo distribúcia cez koncentračný rozsah, aby sa umožnilo uzatvorenie hladín. Požaduje sa jedno aj druhé z týchto meraní.

1.7.2. **Koncepcia odhadu NOEC/LOEC za použitia analýzy odchýlok**

Na každú koncentráciu je najvhodnejšie mať niekoľkonásobné nádrže a štatistická analýza sa vykonáva na úrovni nádrže (10). Bez paralelných nádrží nemôže byť uvoľnený žiaden rozptyl na odchýlku medzi nádržami pre jednotlivé ryby. Avšak skúsenosti ukázali (11), že odchýlka medzi nádržami bola veľmi malá v porovnaní s vnútronádržovou (t. j. medzi rybami) v prípade skúšania. Z toho dôvodu je akceptovateľná alternatívna štatistická analýza vykonaná na úrovni jednotlivých rýb.

Obvykle sa používa najmenej päť testovaných koncentrácií v geometrickom rade s faktorom nepresahujúcim hodnotu 3,2.

Vo všeobecnosti, ak sa vykonáva test s niekoľkonásobnými nádržami, počet kontrolných paralelných nádrží a teda aj počet rýb by mal byť dvojnásobok počtu v každej testovanej koncentrácií, ktorý by mal byť rovnaký (12), (13), (14). Na druhej strane, ak sa nepoužili paralelné nádrže, počet rýb v kontrolnej skupine má byť rovnaký ako počet v každej testovanej koncentrácii.

Ak ANOVA vychádza z nádrží uprednostnených pred jednotlivými rybami, [ktoré môžu mať za následok buď individuálnu klasifikáciu, alebo použitie „pseudo“ špecifickej miery rastu (pozri odsek 21.2.)], je potrebné mať dostatočný počet niekoľkonásobných nádrží, aby bolo možné stanoviť štandardnú odchýlku nádrží v rámci koncentrácie. To znamená, že stupne vôle na chyby v analýze odchýlok by mali byť rovné najmenej 5 (10). Ak sú opakované iba kontrolné skupiny, hrozí nebezpečenstvo, že chyba premenlivosti (variability) bude ovplyvnená, pretože sa môže zvýšiť s veľkosťou hodnoty miery rastu. Keďže miera rastu pravdepodobne poklesne so vzrastajúcou koncentráciou, bude to mať za následok tendenciu nadhodnocovať spomínanú variabilitu.

1.8. POSTUP

1.8.1. **Výber a váženie testovaných rýb**

Je dôležité minimalizovať odchýlku v hmotnosti rýb hneď na začiatku testu. Vhodné rozmedzie veľkostí na rôzne odporučené druhy rýb na tento test sú dané v dodatku 1. Pre celú skupinu rýb použitých v teste by sa mal rozsah individuálnych hmotností na začiatku štartu udržiavať v optimálnom stave ± 10 % aritmetického priemeru hmotnosti a v žiadnom prípade nemôže prekročiť 25 %. Odporúča sa odvážiť aj vedľajšiu vzorku rýb pred testom, aby sa mohla odhadnúť priemerná hmotnosť.

▼B

Zásobná populácia nedostane potravu 24 hodín pred začiatkom testu. Ryby sa potom vyberajú náhodne. Po použití obvyklého anestetika [napr. vodný roztok 100 mg/l tricaine metán sulfonátu (MS 222) neutralizovaného pridaním dvoch dielov bikarbonátu sodného na jeden diel MS 222], ryby budú vážené jednotlivo ako mokrá hmotnosť (vytreté do sucha) s presnosťou danou v dodatku 1. Ryby s hmotnosťou v naplánovanom rozsahu sa ponechajú a potom náhodne rozdelia do testovacích nádob. Je potrebné zaznamenať celkovú mokrú hmotnosť rýb v testovacej nádobe. Použité anestetiká, ako aj manipulácia s rybami (vrátane otierania a váženia) môžu spôsobiť stres a poškodenie mláďat rýb, predovšetkým tých druhov, ktoré sú malých rozmerov. Z tohto dôvodu sa musí manipulácia s mláďatami rýb vykonávať s najväčšou možnou opatrnosťou, aby sa neprivodil stres a poškodenie testovaných zvierat.

Ryby sa opätovne odvážia po 28 dňoch testu (pozri odsek 1.8.6). Ak sa však nazdávame, že je potrebné znova vypočítať dávky krmiva, ryby sa odvážia znovu na 14. deň testu (pozri odsek 1.8.2.3). Na stanovenie zmien vo veľkosti rýb sa môže sa použiť aj iná metóda, napríklad fotografická, na základe ktorej sa môže regulovať dávka potravy.

1.8.2. **Podmienky expozície**

1.8.2.1. *Trvanie*

Test trvá ≥ 28 dní.

1.8.2.2. *Nasadené množstvá a chovná hustota*

Je dôležité, aby nasadené množstvo a chovná hustota boli vhodné na použitý testovaný druh (pozri dodatok 1). Ak je chovná hustota príliš vysoká, stres z nahustenia môže privodiť zníženie miery rastu a chorobnosť násady. Ak je príliš nízka, teritoriálne správanie dokáže ovplyvňovať rast. V každom prípade by nasadené množstvo malo byť dostatočne nízke, aby sa dosiahla koncentrácia rozpustného kyslíka najmenej 60 % AS V bez použitia prevzdušňovača. Skupinové testy (2) ukázali, že u pstruha dúhového je prípustné nasadenie množstva 16 pstruhov o hmotnosti 3 – 5 g v objeme 40 l. Odporúčaná frekvencia výmeny vody počas testu je 6 l/g na telesnú hmotnosť ryby/deň.

1.8.2.3. *Kŕmenie*

Ryby sa budú kŕmiť vhodnou potravou (dodatok 1), a to v dostatočnom množstve, aby sa vyvolala akceptovateľná miera rastu. Treba dbať na to, aby sa neprivodil rast mikroorganizmov alebo zákal vody. U pstruha dúhového je množstvo 4 % z ich telesnej hmotnosti na deň vhodná dávka spĺňajúca tieto podmienky (2), (15), (16), (17). Denná dávka môže byť rozdelená do dvoch porcií a dáva sa rybám v dvoch kŕmeniach za deň, oddelene, najmenej po piatich hodinách. Dávka závisí od počiatočnej celkovej hmotnosti rýb v každej testovacej nádobe. Ak sú ryby znovu vážené v 14-ty deň, dávka sa potom prepočíta. 24 hodín pred vážením sa ryby nekŕmia.

▼B

Nezjedená potrava a fekálny materiál sa odstraňujú z testovacích nádob každý deň, dôkladne sa vyčistí dno každej nádoby pomocou odsávania.

1.8.2.4. *Svetlo a teplota*

Fotoperióda a teplota vody by mali byť vhodné pre testovacie druhy (dodatok 1).

1.8.3. **Testované koncentrácie**

Bežne sa vyžaduje 5 rôznych koncentrácií testovanej látky, podľa variácie koncepcie testu (pozri odsek 1.7.2). Prvotné znalosti o toxicite testovanej látky (napr. z testu akútnej toxicity a/alebo zo štúdií ohľadom rozsahu nálezov) môžu napomôcť pri výbere vhodných testovacích koncentrácií. Ak sa použije menej ako päť koncentrácií, je to potrebné odôvodniť. Najvyššia testovaná koncentrácia by nemala presiahnuť hranicu rozpustnosti testovanej látky vo vode.

Ak sa pri príprave zásaditého roztoku použije činidlo zvyšujúce rozpustnosť testovanej látky, jeho konečná koncentrácia nebude vyššia ako 0,1 ml/l a najvhodnejšie je, ak je rovnaká vo všetkých testovacích nádobách (pozri odsek 1.6.3). Je potrebné však urobiť všetko pre to, aby sme sa vyhli použitiu týchto materiálov.

1.8.4. **Kontroly**

Počet kontrol vodných roztokov závisí od koncepcie testu (pozri odsek 1.7. – 1.7.2.). Ak použijeme rozpustnú chemickú látku, potom je potrebné vykonať aj rovnaký počet jej kontrol, tak ako aj počet kontrol vodných roztokov.

1.8.5. **Frekvencia analytických stanovení a meraní**

Koncentrácia testovanej látky sa počas testu stanovuje v pravidelných intervaloch (pozri dole).

V prietočných testoch by sa mali kontrolovať prietoky zrieďovadla a zásadného roztoku toxickej látky v intervaloch, najlepšie denne a nemali by sa počas testu meniť viac ako o 10 %. Kde sú predpokladané koncentrácie testovanej látky v rozsahu do ± 20 % nominálnych hodnôt (t. j. v rozmedzí od 80 – 120 %, pozri odsek 1.6.2 a 1.6.3), odporúča sa minimálne analyzovať najvyššie a najnižšie testované koncentrácie na začiatku testu a potom následne v týždenných intervaloch. Pri teste, kde sa neočakáva, že koncentrácia testovanej látky zostane do ± 20 % nominálu (na základe údajov o stabilite testovanej látky), je potrebné analyzovať všetky testované koncentrácie, ale podľa rovnakého režimu.

V semistatických testoch, kde sa očakáva, že koncentrácia testovanej látky zostane na ± 20 % nominálnej hodnoty, čo je odporučené ako minimálna koncentrácia, najvyššie a najnižšie testované koncentrácie sa analyzujú ak sú čerstvo pripravené a ihneď pred výmenou na začiatku štúdie a potom v týždenných intervaloch. V testoch, kde sa neočakáva, že koncentrácia testovanej látky zostane na ± 20 % nominálnej koncentrácie, všetky testované koncentrácie musia byť analyzované podľa rovnakého režimu ako stabilizujúce látky.

▼B

Odporúča sa, aby výsledky boli založené na meraných koncentráciách. Ak je však z evidencie preukázateľné, že koncentrácia testovanej látky v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v ± 20 % nominálu alebo nameranej počiatočnej koncentrácie počas testu, potom môžu výsledky vychádzať z nominálnej koncentrácie alebo nameranej hodnoty.

Vzorky je potrebné filtrovať (napr. použitý filter s veľkosťou pórov 0,45 μm) alebo odstreďovať. Odstreďovanie je odporučený postup. Ak sa však testovaný materiál neabsorbuje na filtri, filtrácia je tiež akceptovateľná.

Vo všetkých testovacích nádobách sa musí počas testu merať rozpustený kyslík, pH a teplota. Celkovú tvrdosť vody, alkalitu a salinitu (ak je podstatná) je potrebné merať v kontrolných nádobách a v jednej nádobe s najvyššou koncentráciou testovanej látky. Minimálne sa však musí merať 3-krát: rozpustný kyslík a solicita (ak je dôležitá), a to na začiatku, v strede a nakonci testu. V semistatických testoch sa odporúča, aby sa rozpustný kyslík meral častejšie, najlepšie pred a po každej výmene vody alebo najmenej raz za týždeň. Hodnota pH sa meria na začiatku a po každej výmene vody v statickom obnovovacom teste, a to týždenne v prietočnom teste. Tvrdosť vody a alkalita sa meria raz počas testu. Teplota sa monitoruje kontinuálne aspoň v jednej testovacej nádobe.

1.8.6. **Pozorovania**

Hmotnosť: na konci testu všetky prežívajúce ryby musia byť odvážené ako mokrá hmotnosť (trené do sucha) jednak v skupinách v testovacej nádobe alebo individuálne. Váženie zvierat v testovacej nádobe sa preferuje pred individuálnym vážením rýb, ktoré si vyžaduje, aby ryby boli jednotlivo označené. V prípade váženia jednotlivcov, stanovenie špecifickej miery rastu pre jednotlivé ryby, vybratá technika označovania, môžu spôsobiť stres zvieraťu (alternatívne označovanie mrazením je vhodné, napr. použitie farebnej jemnej rybárskej linky).

Ryby sa kontrolujú denne počas testovacieho obdobia a všetky vonkajšie abnormality (ako napr. krvácanie, odfarbenie) a abnormálne správanie, sa zaznamenávajú. Každý úhyn musí byť zapísaný a uhynutá ryba musí byť odstránená tak rýchlo, ako je to možné. Mŕtve ryby sa nenahrádzajú, nasadené množstvo (sádka), hustota chovu sú dostatočné, aby spôsobili vplyv na rast cez zmeny v počte rýb na nádrž. Musí sa však upraviť dávka potravy.

2. **ÚDAJE A SPRÁVA**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Odporúča sa, aby sa štatistika zahrnula aj do návrhu aj do analýzy testu, keďže táto testovacia metóda pripúšťa opodstatnené variácie v návrhu experimentu (ako napr. v počte testovacích komôr, v počte testovaných koncentrácií, v počte rýb atď.). Z pohľadu možností prípustných v návrhu testu nie je daný presný postup na štatistickú procedúru.

▼B

Miera rastu sa nedá vypočítať pre nádobu, v ktorej úmrtnosť dosiahla 10 %. Mieru úmrtnosti je však možné indikovať na všetky stupne koncentrácie.

Bez ohľadu na to, ktorá metóda na analýzu údajov sa použije, najdôležitejším pojmom je špecifická miera rastu medzi časom t_1 a časom t_2. Môže sa definovať viacerými spôsobmi v závislosti na tom, či venujeme pozornosť jednotlivým rybám alebo nie, alebo či sa požaduje priemer z nádrže.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

kde:

r_1 = individuálna špecifická miera rastu ryby

r_2 = priemerná špecifická miera rastu pre nádrž

r_3 = „pseudo“ špecifická miera rastu

w_1, w_2 = hmotnosti jednej ryby v čase t_1 a t_2, jednotlivo

$\log_e w_1$ = dekadický logaritmus individuálnej hmotnosti ryby na začiatku štúdie

$\log_e W_2$ = dekadický logaritmus individuálnej hmotnosti ryby na konci štúdie

$\log_e W_1$ = priemerná hodnota dekadického logaritmu z hodnoty w_1 pre rybu v nádrži na začiatku štúdie

$\log_e W_2$ = priemerná hodnota dekadického logaritmu z hodnoty w_2 pre rybu v nádrži na konci štúdie

t_1, t_2 = čas (dni) štart a koniec štúdie

r_1 r_2 r_3 môžu byť vypočítané pre 0 – 28-dňové obdobie a kde je to vhodné (t. j. ak bolo meranie vykonané v 14. dni) na 0 – 14 a 14 – 28 dní periód.

2.1.1. **Regresná analýza výsledkov (modelovanie závislosti koncentrácie)**

Táto analytická metóda zavádza vhodné matematické vzťahy medzi špecifickou mierou rastu a koncentráciou, a teda umožňuje odhad „EC_x“ t. j. akejkoľvek požadovanej EC hodnoty. Použitie tejto metódy na výpočet r pre jednotlivú rybu (r_1) nie je potrebné a namiesto toho analýza môže vychádzať z priemernej hodnoty pre nádrž r (r_2). Uprednostňuje sa použitie poslednej metódy. Je taktiež vhodnejšia v prípade menších druhov rýb.

Špecifická priemerná miera rastu pre nádrž (r_2) môže byť graficky znázornená oproti koncentrácií, aby sa zistil vzťah koncentračnej odozvy.

▼B

Pre vyjadrenie vzťahu medzi r_2 a koncentráciou je potrebné vybrať model a výber musí byť podložený patričným zdôvodnením.

Ak počet rýb, ktoré prežili do konca testu, nie je rovnaký v každej nádrži, potom proces zavádzania modelu, či jednoduchého alebo nelineárneho, musí byť vážený, aby pripúšťal nerovnakú veľkosť skupín.

Metóda zavádzania modelu musí umožňovať odhad, napríklad EC_{20} alebo jej rozptyl/štandardná odchýlka alebo interval spoľahlivosti/, aby sa dali tieto odvodiť. Graf vybratého modelu by mal ukazovať, či je model primeraný (8), (18), (19), (20).

2.1.2. **Analýza výsledkov pre odhad LOEC**

Ak test zahŕňa kópie/repliky/nádrže, odhad LOEC môže vychádzať z analýzy odchýlok (ANOVA) špecifickej miery rastu pre nádrž (pozri odsek 2.1), podľa vhodnej metódy [napr. Dunnettov alebo Williamsov test (12), (13), (14), (21)] porovnávajúci priemernú hodnotu na každú koncentráciu s priemernou hodnotou na kontrolu nádrže, aby sa zistila najnižšia koncentrácia, pre ktorú je odchýlka významná pri hodnote 0,05 stupňa pravdepodobnosti. Ak sa požadované predpoklady parametrických metód nezhodujú, použije sa netypická distribúcia (napr. Shapiro-Wilkov test) alebo heterogénna odchýlka (Barlettov test) na transformovanie údajov na homogénnu odchýlku, a to prednostne pred vykonaním ANOVA alebo váženým ANOVA testom.

Ak test neobsahuje paralelné nádrže pre každú koncentráciu, ANOVA vychádzajúca z nádrží bude necitlivá alebo nemožná. V tejto situácii je akceptovateľným kompromisom ANOVA, vychádzajúca z „pseudo“ špecifickej miery rastu r_3 pre jednotlivé ryby.

Priemerná hodnota r_3 na každú testovanú koncentráciu sa môže potom porovnávať s priemernou hodnotou r_3 na kontrolné nádrže a LOEC sa môže identifikovať rovnako ako v predchádzajúcom prípade. Musí byť jasné, že táto metóda neposkytuje žiadnu dovolenú odchýlku alebo ochranu voči premenlivosti medzi nádržami, okrem tej, ktorá bola vypočítaná na premenlivosť medzi jednotlivými rybami. Skúsenosti (8) však ukázali, že premenlivosť medzi nádržami je veľmi malá v porovnaní s variabilitou v rámci nádrže (t. j. medzi jednotlivými rybami). Ak nie sú do analýzy zahrnuté jednotlivé ryby, je potrebné zdôvodniť použitie metódy vonkaj šej identifikácie.

2.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Výsledky sa musia interpretovať opatrne, ak namerané koncentrácie jedovatých látok v testovaných rozsahoch dosahujú úrovne blízke detekčným limitom analytickej metódy alebo v semistatických testoch, kde koncentrácia testovanej látky klesá medzi koncentráciu v čerstvo pripravenom roztoku a koncentráciou pred výmenou roztoku.

2.3. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať nasledujúce informácie:

▼B

2.3.1. **Testovaná látka**

— fyzikálne vlastnosti a závažné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje chemickej látky zahrňujúce čistotu a analytickú metódu na kvantitatívne stanovenie testovanej látky, ak je to vhodné.

2.3.2. **Testované druhy**

— podľa možnosti vedecký názov,

— rod, veľkosť, dodávateľ, možná predpríprava atď.,

2.3.3. **Podmienky testu**

— používaná testovacia metóda (napr. semistatická/obnovovacia, prietočná, nakladanie, chovná hustota atď.),

— koncepcia testu (napr. počet testovacích nádob, testované koncentrácie a paralelné stanovenie, počet rýb v nádrži),

— metóda prípravy zásobného roztoku a frekvencia obnovy (ak bolo použité činidlo rozpustnosti, jeho koncentrácia musí byť daná),

— nominálna testovaná koncentrácia, priemery nameraných hodnôt a ich štandardné odchýlky v testovacích nádobách a metóda, ktorou boli tieto hodnoty získané a dôkaz o tom, že merania zodpovedajú koncentráciám testovanej látky v skutočnom roztoku,

— charakteristiky vody použitej na riedenie: pH, tvrdosť, alkalita, teplota, rozpustný kyslík, reziduálny chlór, ak bol stanovený celkový organicky viazaný uhlík, suspendované látky, salinita (obsah solí) z testu prostredia (ak bola stanovená) a iné vykonané merania,

— kvalita vody v testovacích nádržiach: pH, tvrdosť, teplota a koncentrácia rozpustného kyslíka,

— podrobné informácie o kŕmení (napr. druh potravy/zdroj, dávkované množstvo a frekvencia)

2.3.4. **Výsledky**

— dôkaz, že kontrolné nádrže splnili kritériá validity prežívania a údaje o úmrtnosti vyskytujúcej sa pri niektorej z testovaných koncentrácií;

— používané štatistické analytické techniky, štatistiky vychádzajúce z počtu paralelných stanovení alebo na jednotlivých rybách, spracovanie dát a odôvodnenie použitia danej techniky;

— údaje v tabuľkovej forme na jednotlivú a priemernú hmotnosť rýb v dňoch 0, 14 (ak merané) a 28 hodnôt v priemere na nádrž alebo hodnoty „pseudo“ špecifickej miery rastu (ak je to vhodné) počas obdobia 0. – 28. dňa alebo ak je to možné na 0. – 14. a 14.– 28. deň;

— výsledky štatistickej analýzy (t. j. regresnej analýzy alebo ANOVA), najlepšie v tabuľkovej alebo grafickej forme a LOEC ($p = 0,05$) a NOEC alebo ECx so štandardnými chybami;

▼B

— rozsah neobvyklých reakcií rýb a akékoľvek viditeľné účinky vyvolané testovanou látkou.

3. POUŽITÁ LITERATÚRA

(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.

[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, s. 231 – 236.]

(2) Ashley S., Mallett M. J. and Grandy N. J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

(3) Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, s. 1855 – 1870.

(4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and Hôfte 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, s. 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, s. 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, s. 328 – 338.

(9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 pp.

(10) Cox D. R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

(11) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12. December 1991.

(12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc, 50, s. 1096 – 1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, s. 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, s. 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, s. 123 – 133.

(16) Quinton, J. C. and Blake, R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Fish Biology, 37, pp. 33 – 41.

(17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 pp.

(18) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data Environ. Toxicol. Chem. 11, s. 1485 – 1494.

(19) DeGraeve, G. M., Cooney, J. M., Pollock, T. L., Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and Mclntyre, D. O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.

(20) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 s.

(21) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, s. 510 – 531.

▼B

DODATOK 1

DRUHY RÝB ODPORUČENÝCH NA TESTOVANIE A VHODNÉ PODMIENKY NA VYKONANIE TESTOV

Druh	Odporučený rozsah teplôt pri testoch (°C)	Fotoperióda (hod.)	Odporúčany rozsah pre počiatočnú hmotnosť (g)	Požadovaná presnosť merania	Nasadené množstvo (g/l)	Chovná hustota (l)	Potrava	Trvanie testu (dni)
Odporučené druhy:								
Oncorhynchu s mykiss Pstruh dúhový	12,5 – 16,0	12 – 16	1 – 5	na 100 mg	1,2 – 2,0	4	sušená lososovitá potrava	≥ 28
Ostatné dobre zdokumentov ané druhy:								
Danio rerio Zebrička	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	na 1 mg	0,2 – 1,0	5 – 10	živá potrava (*Brachionus Artemia*)	≥ 28
Oryzias latipes Ryžová rybka (Medaka)	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	na 1 mg	0,2 – 1,0	5 – 20	živá potrava *(Brachionus Artemia)*	≥ 28

▼B

DODATOK 2

NIEKTORÉ CHARAKTERISTIKY VHODNEJ VODY NA RIEDENIE

Látka	Koncentrácie
Látka v časticiach	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Zlúčený uhlík	< 1 µg/l
Zostatkový chlór	< 10 µg/l
Celkové organofosfátové pesticídy	< 50 ng/l
Celkové organochlórované pesticídy plus polychlórované bifenyly	< 50 ng/1
Celkový organický chlór	< 25 ng/1

▼B

DODATOK 3

Logaritmické série koncentrácií vhodných na test na toxicitu (9)

Stĺpec (čislo koncentrácie medzi 100 a 10 alebo medzi 10 a 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

(*) Zo stĺpcov sa dá vybrať päť alebo viac sérií za sebou idúcich koncentrácií. Stredné body medzi koncentráciami v stĺpci x) sa nachádzajú v stĺpci (2x + 1). Uvedené hodnoty predstavujú koncentrácie vyjadrené ako percento na objem alebo hmotnosť (mg/l alebo µg/l). Hodnoty je možné násobiť alebo deliť akoukoľvek mocninou 10 podľa potreby. Hodnoty v stĺpci 1 sa môžu použiť, ak nastala značná neistota ohľadom úrovne toxicity.

▼B

C.15. RYBY, KRÁTKODOBÝ TEST TOXICITY NA EMBRYÁCH A VÝVOJOVOM ŠTÁDIU PLODOVÉHO VAKU

1. METÓDA

Táto testovacia metóda krátkodobého testu toxicity je totožná s metódou OECD TG 212 (1998).

1.1. ÚVOD

Tento test toxicity na rybích embryách a rybách vo vývojovom štádiu plodového vačku – poteru je krátkodobým testom, v ktorom sú vývojové štádiá od čerstvo oplodnených vajíčok po koniec štádia plodového vaku – poteru vystavené účinkom testovanej látky. Rybie embryá a štádiá plodového vaku – poteru sa nekŕmia a test má byť ukončený dovtedy, kým sú rybám v štádiu plodového váčku dodávané živiny zo žĺtkového vaku.

Test je určený na definovanie letálnych účinkov a hraníc subletálnych účinkov chemikálií na vybraté testované vývojové štádiá a druhy rýb. Mal by preto poskytnúť užitočné informácie o tom, či je možné a) nájsť spojitosť medzi letálnymi a subletálnymi testami, b) použiť ho ako screeningový test jednak ako test pre najrannejšie vývojové štádiá alebo ako test chronickej toxicity a c) či je použiteľný pri testovaní druhov tam, kde techniky chovu hospodárenia nie sú dostatočne vyspelé, aby pokryli obdobie zmien od endogénneho k exogénnemu kŕmeniu.

Je potrebné uvedomiť si, že iba testy spájajúce všetky štádiá životného cyklu rýb sú vo všeobecnosti schopné podať presný odhad chronickej toxicity chemikálií u rýb a že pôsobenie obmedzené akýmkoľvek spôsobom s ohľadom na štádium života môže znižovať citlivosť a zároveň podhodnotiť chronickú toxicitu. Preto možno očakávať, že embryonálny test a test v štádiu plodového vaku – poteru môže byť menej citlivý ako najrannejší test úplne vývojového štádia, predovšetkým s ohľadom na vysoko lipofilné chemikálie (log P_{ow} > 4) a chemikálie so špeciálnymi spôsobmi toxickej aktivity. Pri chemikáliách s nešpecifickými, narkotickými účinkami sa však môžu očakávané menšie rozdiely v senzitivite medzi dvoma testami (1).

Pred uverejnením testu sa najviac skúseností získalo v testoch na embryonálne štúdium a na štádium plodového vaku – poteru u sladkovodných rýb *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae – bežný názov zebrafish). Podrobnejší návod na vykonanie testu pre tento druh je uvedený v dodatku 1. Toto však nevylučuje použitie iných druhov rýb, s ktorými sú tiež skúsenosti (tabuľka 1).

1.2. DEFINÍCIE

Najnižšia zistená účinná koncentrácia (LOEC): je najnižšia skúmaná koncentrácia testovanej látky, pri ktorej sa pozoruje signifikantný účinok ($p < 0,05$) pri porovnaní s kontrolnou vzorkou. Všetky testované koncentrácie nad LOEC musia mať však škodlivý vplyv rovnajúci sa alebo väčší ako ten, ktorý bol zistený pri LOEC.

Nezistená účinná koncentrácia (NOEC): je testovaná koncentrácia hneď pod LOEC.

▼B

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Embryá a vývojové štádium plodového vaku – poteru rýb sú vystavené účinkom rôznych koncentrácií testovanej látky rozpustenej vo vode. V protokole o teste je možný výber medzi semistatickým a prietočným typom postupu. Výber závisí od charakteru testovanej látky. Test začína umiestnením oplodnených vajíčok do testovacej komory a končí práve predtým, ako ktorákoľvek z lariev v ktorejkoľvek testovanej komore komplexne absorbuje žĺtkový vak alebo pred uhynutím v dôsledku začínajúceho hladovania v kontrolnej komore. Letálne a subletálne účinky sa vyhodnotia a porovnávajú s kontrolnými hodnotami, ak bola stanovená najnižšia zistená účinná koncentrácia alebo sa podrobia analýze použitím regresného modelu, aby sa odhadla koncentrácia, ktorá môže zapríčiniť daný percentuálny účinok (t. j. LC/ECx, kde x je definované ako % účinnosti).

1.4. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

Výsledky aktuálneho testu toxicity, (pozri metóda C.1) najlepšie toho, ktorý bol vykonaný na druhu ryb vybratom na tento test, musia byť k dispozícii. Môžu byť užitočné pri výbere vhodného rozsahu testovaných koncentrácií na test v ranných vývojových štádiách života ryb. Rozpustnosť vo vode (vrátane rozpustnosti v testovanej vode) a tlak pár testovanej látky musia byť známe. Je potrebné mať spoľahlivú analytickú metódu na kvantitatívne stanovenie látky v testovaných roztokoch so známou a uvedenou presnosťou a detekčným limitom.

Informácie o testovanej látke, ktoré sú použité pri stanovení podmienok testu, zahŕňajú štruktúrny vzorec, čistotu látky, svetelnú stabilitu, stabilitu za podmienok testu, pK_a, P_{ow} a výsledky testov na stupeň biodegradability stupeň biologickej odbúrateľnosti (pozri metóda C.4).

1.5. PLATNOSŤ TESTU

Na platnosť testu je potrebné uplatňovať nasledujúce podmienky:

— počet všetkých oplodnených vajíčok, ktoré prežili v kontrolnej nádrži a ak je to dôležité, iba v nádobách s rozpúšťadlom, musí byť väčší alebo rovný limitom definovaným v doplnkoch (2) a (3),

— koncentrácia rozpusteného kyslíka musí byť počas testu v rozmedzí 60 až 100 % z hodnoty saturácie vzduchu (ASV),

— teplota vody sa nesmie meniť viac ako ± 1,5 °C medzi testovanými komorami alebo medzi nasledujúcimi dňami v určitom časovom intervale testu a bude v rozsahu teplôt určených na testované druhy (dodatky 2 a 3).

▼B

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. **Testovacie komory**

Môžu sa používať nádoby sklenené alebo z iných chemicky inertných látok. Rozmery nádob musia byť dostatočne veľké, aby boli v súlade s nasadeným množstvom rýb (pozri odsek 1.7.1.2). Odporúča sa umiestniť testovacie nádoby náhodne na testovacej ploche. Náhodný blokový dizajn, v ktorom je každý postup prítomný v každom bloku, je najlepší, aby sa zabezpečil úplne náhodný dizajn, v ktorom sú zahrnuté vplyvy laboratória, takže na kontrole sa môže využiť testovanie po blokoch. Ak použijeme testovanie po blokoch, budú sa brať do úvahy aj následné údaje analýzy. Testované komory sa takto ochránia pred nechcenými vplyvmi.

1.6.2. **Výber druhov rýb**

Odporúčané druhy rýb sú dané v tabuľke 1A. To ale neobmedzuje použitie aj iných druhov (príklady uvedené v tabuľke 1B), ale testovací postup musí byť prispôsobovaný tak, aby poskytoval uspokojivé podmienky testu. V tomto prípade je potrebné zaznamenať dôvody, ktoré viedli k výberu iných druhov a experimentálnych metód.

1.6.3. **Chov húfu rýb**

Podrobnosti o chovaní rýb počas množenia za vhodných podmienok nájdete v OECD TG 210 ([1]) metóde a v použitej literatúre (2), (3), (4), (5), (6).

1.6.4. **Manipulácia s embryami a larvami**

Embryá a larvy môžu byť vystavené expozícii v malých vyhovujúcich nádobách so sieťovanými stenami, aby sa umožnilo pretekanie testovaného roztoku cez nádobu. Neturbulentný tok cez tieto malé nádoby je zabezpečený ich zavesením na ramene usporiadanom na pohyb nadol a nahor, ktoré však udržuje organizmy ponorené. Je možné použiť systém prietočný – sifónový. Oplodnené vajíčka lososovitých rýb môžu byť udržované na krmidlách alebo na sieťovine s dostatočne veľkými okami, aby mohli cez ne po vyliahnutí prepadnúť. Na premiestňovanie embryí a lariev pri semistatických testoch s kompletnou dennou výmenou (pozri odsek 1.6.6.) vody je vhodné použiť pasteurove pipety.

Ak sa v hlavnej testovacej nádobe na zadržiavanie vajíčok použili kontajnery, mriežky alebo sieťky, potom po vyliahnutí lariev môžu byť tieto zábrany odstránené [2] s výnimkou, ak mriežky preventívne zabraňujú úniku rýb. Ak je potrebné premiestniť larvy, tieto by nemali byť vystavené vzduchu a nemali by sa používať sieťky na vylovenie rýb z kontajnerov na vajíčka (upozornenie sa netýka menej krehkých druhov rýb, napr. kapra). Načasovanie takéhoto prenosu sa mení v závislosti od druhu rýb a prenos nie je vždy potrebný. Pri semistatickej technike môžeme používať hadičky alebo plytké zásobníky a ak je to nutné, môžu byť vybavené prepážkou zo sieťoviny, nepatrne naddvihnutou nad dnom hadičky. Ak je objem týchto kontajnerov dostatočný, aby vyhovoval požiadavkám pre nasadené množstvo vsádky (poyri 1.7.1.2), žiaden prenos embryí alebo lariev nebude nutný.

([1]) OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, „Fish, Early-life Stage Toxicity Test“.

▼B

1.6.5. **Voda**

Každá voda, spĺňajúca chemické charakteristiky na vodu na riedenie tak, ako sú uvedené v zozname v dodatku 4 a v ktorej testované druhy vykazujú kontrolu prežívania najmenej takú dobrú, ako bolo popísané v dodatkoch 2 a 3, je vhodná ako testovacia voda. Voda má mať konštantnú kvalitu počas celého trvania testu. Jej pH hodnota by sa mala pohybovať v rozmedzí ± 0,5 jednotiek pH, aby sa zabezpečilo, že riedenie nebude mať neželaný vplyv na výsledky testu/napr. vytváranie komplexov s testovanou látkou/alebo nepriaznivý účinok na vyliahnuté zásobné ryby. Vzorky vody na analýzu je potrebné odoberať v určitých intervaloch. Meranie hodnôt ťažkých kovov (napr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd a Ni), hlavných aniónov a katiónov (napr. Ca, Mg, Na, K, Cl a SO_4, pesticídov (napr. celkový obsah organofosforečňanových alebo celkový obsah organochlórovaných pesticídov), celkového organicky viazaného uhlíka v suspendovaných látkach by sa malo vykonávať napr. každé tri mesiace, ak je známe, že zrieďovacia voda má relatívne konštantnú kvalitu. Ak sa preukázalo, že kvalita vody sa upravila najmenej počas jedného roka, merania sa môžu vykonávať menej často a časové intervaly medzi nimi sa môžu predĺžiť (napr. každých šesť mesiacov).

1.6.6. **Testovacie roztoky**

Testovacie roztoky vybratých koncentrácií sa pripravujú riedením zásobných roztokov.

Zásobný roztok môže byť pripravený najčastejšie jednoduchým zmiešaním alebo pretrepávaním testovanej látky v zrieďovacej vode mechanickým spôsobom (napr. trepaním alebo ultrazvukom). Saturácia kolón môže byť využitá na dosiahnutie vhodne koncentrovaných zásobných roztokov. Pokiaľ je to možné, vyhneme sa používaniu rozpúšťadiel a dispergentov (činidlá zvyšujúce rozpustnosť látok), hoci u niektorých zlúčenín v určitých prípadoch sa to vyžaduje, aby sa pripravil vhodne koncentrovaný zásobný roztok. Príklady vhodných rozpúšťadiel sú acetón, metanol, etanol, dimetylformamid a trichylénglykol. Príkladmi používaných dispergentov sú Cremophor RH40, Tween 80, meťnylcellulose 0,01 % a HCO-40. Treba dbať na to, ak sa používajú ľahké činidlá (napr. acetón) a/alebo veľmi prchavé biologicky odbúrateľné látky, môžu tieto spôsobiť problémy s množením baktérií v prietočných testoch. Ak používané činidlo zvyšuje rozpustnosť, nesmie mať žiaden signifikantný účinok na prežívanie alebo žiaden viditeľný nepriaznivý účinok na ranné vývojové štádiá, ako sa to prejavilo v kontrolných nádržiach s rozpúšťadlom. Je však potrebné vynaložiť maximálne úsilie, aby sme sa vyhli použitiu týchto látok.

Pri semistatických technikách môžu nasledovať dva rôzne postupy obnovy: i) do čistých nádob sa pripravia nové testovacie roztoky a prežívajúce vajíčka a larvy sa do nich opatrne prenesú v malých objemoch starého roztoku tak, aby sme sa vyhli ich vystaveniu na vzduchu alebo ii) testované organizmy zostanú umiestnené v nádobách, pokiaľ sa časť (najmenej tri štvrtiny) testovanej vody vymení. Frekvencia obnovy prostredia bude závisieť na stabilite testovanej látky, ale odporúča sa denná výmena. Ak z predbežných testov stability (pozri odsek 14) testovanej látky vyplýva, že koncentrácia testovanej látky nie je stála (t. j. mimo rozsahu 80 – 120 % nominálnej koncentrácie alebo poklesne pod 80 % nameranej počiatočnej koncentrácie) počas obnovovacej periódy, je dôležité použiť prietočný test. V tomto prípade je treba dbať na to, aby sme sa vyhli stresovaniu lariev počas výmeny vody.

▼B

Pri prietočných testoch, v ktorých je systém kontinuálne vypúšťaný a riedený (napr. dávkovacie meracie pumpy, proporcionálny zrieďovač, saturačný systém), zásobný roztok testovanej látky sa vyžaduje dodávať do testovacích nádrží v sériách koncentrácií. Prietoky zásobných roztokov a zrieďovacej vody treba kontrolovať v určitých časových intervaloch, najlepšie denne a nemal by sa meniť viac ako o 10 % počas testu. Prekročené množstvo ekvivalentné objemu najmenej piatich testovacích komôr za 24 hodín sa pokladá za vyhovujúce (2).

1.7. POSTUP

Užitočné informácie o vykonaní testov toxicity na rybích embryách a v štádiu plodového vaku – poteru sú dostupné v literatúre, niektoré príklady sú zahrnuté do zoznamu použitej literatúry v texte (7), (8), (9).

1.7.1. **Podmienky expozície**

1.7.1.1. *Dĺžka testu*

Test je najlepšie začať 30 minút po oplodnení vajíčok. Embryá sa ponoria do testovaného roztoku pred alebo čo najskôr po začatí štádia štiepenia blastodiskov a v žiadnom prípade nie pred započatím štádia gastrulí. Pri vajíčkach od komerčných dodávateľov nie je vhodné začať test ihneď po oplodnení. Ak pozdržanie začiatku testu závažne ovplyvňuje senzibilitu testu, je ho potrebné začať do ôsmich hodín po oplodnení. Ak nie sú larvy kŕmené počas expozičnej periódy, test treba ukončiť práve predtým, ako žĺtkové vačky lariev v testovaných komorách boli kompletne absorbované alebo predtým ako začnú hynúť od hladu v kontrolných komorách. Dĺžka testu bude závisieť od použitých druhov. Niektoré odporúčané dĺžky trvania testov sú uvedené v dodatkoch 2 a 3.

1.7.1.2. *Nasádzanie*

Počet oplodnených vajíčok na začiatku testu musí byť dostatočný na to, aby sa splnili štatistické požiadavky. Rozdelia sa náhodne, najmenej však po 30 oplodnených vajíčok, rozdelených rovnako, alebo tak rovnako ako je to možné. Môže byť dosť zložité získať rovnaké vsádky, ak použijeme niektoré druhy medzi najmenej tri paralelné testovacie komory na jednu koncentráciu. Nasadené množstvo (biomasa) na objem testovaného roztoku má byť dostatočne nízke, aby sa koncentrácia rozpusteného kyslíka udržiavala na hodnote najmenej 60 % ASV bez prevzdušňovania. Pri prietočných testoch sa odporúča, aby nasadené množstvo neprekročilo 0,5 g/l počas 24 hodín a nesmie nikdy prekročiť množstvo 5 g/l roztoku (2).

1.7.1.3. *Svetlo a teplota*

Fotoperióda a teplota majú byť vhodné na testované druhy (dodatky 2 a 3). Ak chceme monitorovať teplotu, je vhodné použiť ďalšiu testovaciu nádobu.

▼B

1.7.2. **Testované koncentrácie**

Obvykle sa vyžaduje päť koncentrácií testovanej látky s odstupom s konštantným faktorom nepresahujúcim 3,2. Pri výbere rozsahu testovaných koncentrácií, je potrebné brať do úvahy krivku vzťahujúcu LC_{50} na dobu expozície v štúdii akútnej toxicity. Za určitých okolností je vhodné použiť menej ako päť koncentrácií, napr. v limitných testoch a v užších koncentračných intervaloch. Koncentrácia látky vyššia ako 96 hodín LC_{50} alebo 100 mg/l a tá, ktorá z nich je nižšia, nemusí byť testovaná. Látky sa nemali testovať pod ich hranicou rozpustnosti v testovacej vode.

Ak sa použije činidlo zvyšujúce rozpustnosť, aby napomohlo pri príprave testovaných roztokov (pozri odsek 16.6.), jeho konečná koncentrácia v testovaných nádobách nemá byť vyššia ako 0,1 ml/l a nemala by byť rovnaká vo všetkých testovaných nádobách.

1.7.3. **Kontrola**

Jedna kontrolná nádrž zrieďovacej vody (replikát, paralela ak je to možné) a tiež, ak je to dôležité, jedna kontrolná nádrž obsahujúca činidlo zvyšujúce rozpustnosť (replikát, paralela, ak je to možné) sa musí zanalyzovať v dodatočnej testovacej sérii.

1.7.4. **Frekvencia analytických stanovení a meraní**

Koncentrácie testovanej látky sú stanovené v pravidelných časových intervaloch počas doby testu.

V semistatických testoch, kde sa očakáva, že koncentrácia zostane na ± 20 % nominálu (t. j. v rozsahu 80 – 120 %, pozri odseky 1.4 a 1.6.6), čo je odporúčané ako minimálna koncentrácia, najvyššie a najnižšie testované koncentrácie sa analyzujú, ak sú čerstvo pripravené a ihneď po výmene, najmenej trikrát v pravidelných časových odstupoch v priebehu testu (t. j. analýzy by sa mali vykonať na vzorkách z rovnakého roztoku, ak je tento čerstvo pripravený, a to pri výmene).

Pri testoch, kde sa neočakáva, že koncentrácia testovanej látky zostane na ± 20 % z nominálu (na základe údajov o stabilite látky), je potrebné analyzovať všetky testované koncentrácie pre čerstvo pripravené a vymenené roztoky, ale podľa rovnakého režimu (t. j. najmenej trikrát v pravidelných časových odstupoch v priebehu testu). Stanovenie koncentrácií testovanej látky pred výmenou je potrebné vykonať iba v jednej paralelnej (replikačnej) nádobe pre každú testovanú koncentráciu. Stanovenia je potrebné vykonať do siedmich dní po odbere vzoriek. Odporúča sa to pre prípad, že výsledky budú vychádzať z nameraných koncentrácií. Ak však záznamy dokazujú, že koncentrácia testovanej látky v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v ± 20 % z nominálu alebo nameranej počiatočnej koncentrácie počas testu, potom výsledky môžu vychádzať z nominálu alebo nameranej počiatočnej hodnoty koncentrácie.

Na prietočné testy je vhodný podobný režim so vzorkami ako je uvedený na semistatické testy (ale meranie „starého“ roztoku nie je v tomto prípade možné). Ak však test trvá viac ako sedem dní, je možno vhodné zvýšiť počet vzorkovaní počas prvého týždňa, napr. tri série meraní, aby sa zistilo, že testované koncentrácie zostávajú nezmenené.

▼B

Vzorky si môžu vyžadovať odstreďovanie alebo filtrovanie za použitia filtra s pórmi veľkosti 0,45 μm. Pretože ani odstreďovanie ani filtrácia však vždy nedokážu odseparovať biologicky nedostupnú frakciu testovanej látky od tej, ktorá je biologicky dostupná, vzorky by mali byť podrobené spomínaným postupom.

Počas testu je potrebné merať rozpustený kyslík, pH a teplotu vo všetkých testovaných nádobách. Počas kontrol je vhodné merať celkovú tvrdosť vody a obsah solí v nádobe, a to v jednej nádobe s najvyššou koncentráciou. Rozpustený kyslík a obsah solí sa musí merať minimálne trikrát (na začiatku, v strede a na konci testu). Pri semistatických testoch sa odporúča meranie rozpusteného kyslíka s väčšou frekvenciou, najlepšie pred a po každej výmene vody alebo najmenej raz za týždeň. pH je potrebné merať na začiatku a konci každej výmeny vody pri semistatických testoch a najmenej raz týždenne pri prietočných testoch. Tvrdosť vody je vhodné merať raz počas trvania testu. Teplota sa meria denne a najlepšie je kontinuálne monitorovanie najmenej v jednej testovanej nádobe.

1.7.5. **Pozorovania**

1.7.5.1. *Štádium embryonálneho vývoja*

Embryonálne štádium (t. j. štádium gastrulí) na začiatku vystavenia testovanej látke musí byť čo najpresnejšie. Toto overenie sa môže urobiť použitím reprezentatívnej vzorky vajíčok vhodne chránených a vyčíslených. Pri opisovaní a ilustrácii embryonálnych štádií sa odporúča čerpať z odbornej literatúry (2), (5), (10), (11).

1.7.5.2. *Liahnutie a prežívanie*

Pozorovania liahnutia a prežívania by sa mali vykonávať najmenej raz za deň a je potrebné si zaznamenať počet vyliahnutých jednotlivcov. Na začiatku testu sa odporúča vykonávať pozorovania častejšie (napr. každých 30 minút počas prvých troch hodín), keďže v niektorých prípadoch časy prežitia môžu byť dôležitejšie ako iba počet uhynutých kusov (napr. ak sa vyskytujú akútne účinky toxicity). Mŕtve embryá a larvy treba odstrániť ihneď po objavení, pretože sa veľmi rýchlo rozkladajú. Mimoriadnu pozornosť treba venovať tomu, aby sme pri odstraňovaní mŕtvych jedincov neudreli alebo fyzicky nepoškodili susedné vajíčka/larvy, ktoré sú extrémne krehké a citlivé. Kritériá úhynu sa menia podľa vývojového štádia:

— **u vajíčok**: predovšetkým v ranných štádiách, výrazná strata priehľadnosti a zmeny v zafarbení, spôsobené koaguláciou a/alebo znížením proteínov, vedúcim k bielemu nepriehľadnému vzhľadu,

— **u embrií**: absencia telesného pohybu a/alebo absencia tepu srdca a/alebo nepriehľadné odfarbenie pri druhoch, ktorých embryá sú normálne priehľadné,

— **u lariev**: nepohyblivosť a/alebo neprítomnosť respiračných pohybov a/alebo neprítomnosť tepu srdca a/alebo biele nepriehľadné zafarbenie centrálneho nervového systému a/alebo strata reakcií na mechanické stimuly.

▼B

1.7.5.3. *Abnormálny vzhľad*

Počet lariev vykazujúcich abnormality vo forme tela a/alebo pigmentácie v štádiu absorpcie žĺtkového vaku sa zaznamenávajú v príslušných časových úsekoch v závislosti od dĺžky trvania testu a charaktere popísaných abnormalít. Treba poznamenať, že abnormálne embryá a larvy sa vyskytujú prirodzene a môžu byť v rozmedzí niekoľkých percent v kontrolných vsádkach pre niektoré druhy. Je nevyhnutné odstrániť abnormálne uhynuté druhy z testovaných nádob.

1.7.5.4. *Abnormálne správanie*

Abnormality ako napr. hyperventilácia, nekoordinované plávanie a netypická nehybnosť sa musia zaznamenávať v príslušných časových intervaloch, ktoré závisia od doby trvania testu. Tieto vplyvy, hoci ich je ťažké kvantifikovať, môžu (ak sú spozorované) pomôcť pri interpretácii údajov o mortalite t. j. poskytnúť údaje o spôsobe toxických účinkov látky.

1.7.5.5. *Dĺžka*

Na konci testu sa odporúča zmerať dĺžku jednotlivcov: štandardná, dĺžka rozdvojenia alebo celková dĺžka. Možno použiť všetky typy. Ak sa však vyskytne hnitie chvostovej plutvy alebo erózia plutvy, je možné použiť štandardné dĺžky. Všeobecne v dobre prebiehajúcom teste variačný koeficient pre dĺžku medzi replikami kontrolných meraní by mal byť ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Hmotnosť*

Na konci testu je vhodné jednotlivé ryby odvážiť. Uprednostňovaná je suchá hmotnosť (24 hodín pri 60 ^{o}C) pred mokrou hmotnosťou (vysušené do sucha). Všeobecne v dobre prebiehajúcom teste variačný koeficient pre hmotnosť medzi replikami kontrolných meraní by mal byť ≤ 20 %.

Tieto pozorovania budú mať za následok niektoré alebo všetky z nasledujúcich údajov, využiteľné na štatistické analýzy:

— kumulovaná mortalita,

— počet zdravých lariev na konci testu,

— čas začiatku liahnutia a koniec liahnutia (t. j. 90 % vyliahnutých v každej replike),

— počet lariev vyliahnutých za deň,

— dĺžka (a hmotnosť) prežívajúcich zvierat na konci testu,

— počet lariev, ktoré sú zdeformované alebo abnormálneho vzhľadu,

— počet lariev vykazujúce abnormálne správanie.

▼B

2. **ÚDAJE A SPRÁVA**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Odporúča sa, aby sa štatistika začlenila aj do koncepcie a aj analýzy testu, keďže metóda pripúšťa mnohé variácie v koncepcii experimentu, ako napríklad v počte testovaných komôr, počte testovaných koncentrácií, v počiatočnom počte oplodnených vajíčok a v meraných parametroch. Špecifický návod na štatistické postupy nie je daný, vzhľadom na možnosti v koncepcii testov.

Ak sa odhadnú LOEC/NOEC, bude potrebné analyzovať variácie v každej sérii (skupine) použitím analýzy odchýlok (ANOVA) alebo použiť tabuľky neistôt. Aby bolo možné urobiť niekoľkonásobné pozorovanie medzi výsledkami pre jednotlivé koncentrácie a pre kontrolné nádrže, je vhodné použiť Dunnettovu metódu (12), (13). Vhodné príklady sú uvedené v (14), (15). Veľkosť účinku, detegovateľná použitím ANOVA alebo iných postupov (t. j. význam testu), sa vypočíta a zaznamená. Je potrebné poznamenať, že nie všetky pozorovania uvedené v odseku 1.7.5.6. sú vhodné na štatistickú analýzu metódou ANOVA. Napríklad kumulovaná mortalita a počet zdravých lariev na konci testu sa môžu analyzovať metódou pravdepodobnosti.

Ak sú odhadované LC/EC_x a) údajmi, ktoré nás zaujímajú, je vhodné ich znázorniť krivkou napr. logaritmickou, ktorej tvar zistíme použitím štatistických metód napr. metódy najmenších štvorcov alebo nelineárnej metódy najmenších štvorcov. Krivka by mala mať také parametre, aby LC/EC_x pri údajoch, ktoré sledujeme a ich štandardných odchýlkach mohli byť odhadnuté priamo. Toto významne potom uľahčí výpočet intervalov spoľahlivosti pre LC/EC_x. Ak neexistuje dobrý dôvod na výber iných konfidenčných intervalov, stanoví sa obojstranný 95 % konfidenčný interval. Krivka má byť položená tak, aby odchýlka od hodnôt bola priemerne odhadnutá. Môžu sa použiť aj grafické metódy prekladania kriviek. Regresná analýza je vhodná na všetky pozorovania uvedené v odseku 1.7.5.6.

2.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Výsledky by sa mali interpretovať pozorne, najmä ak namerané koncentrácie toxických látok v testovaných roztokoch dosahujú úrovne blízke detekčným limitom analytickej metódy. Interpretácia výsledkov pri koncentráciách nad hodnoty rozpustnosti daných látok vo vode si taktiež vyžaduje obozretnosť.

2.3. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať nasledujúce informácie:

2.3.1. **Testovaná látka**

— fyzikálny charakter a dôležité fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné chemické údaje, zahŕňajúce čistotu a analytickú metódu na kvantifikáciu testovanej látky, ak je to vhodné.

▼B

2.3.2. **Testované druhy**

— vedecký názov, rod, počet rodičovských rýb (t. j. koľko samíc bolo použitých, aby sa získal pre test vyžadovaný počet), zdroj a metóda zberu oplodnených vajíčok a nasledujúca manipulácia.

2.3.3. **Podmienky testu:**

— použitá testovacia procedúra (t. j. semistatická alebo prietočná metóda, časový úsek od oplodnenia po štart testu, vsadené množstvo atď.),

— fotoperiódy,

— koncepcia testu (t. j. počet testovaných komôr a replík, počet embryí v replike),

— metóda prípravy zásobných roztokov a frekvencia obnovy (činidlo zvyšujúce rozpustnosť a jeho koncentrácia, ak bolo použité, musí byť udané),

— nominálne testovacie koncentrácie, namerané hodnoty, ich priemery a ich štandardné odchýlky v testovaných nádobách a metóda, ktorou boli získané a ak je testovaná látka rozpustná vo vode v koncentráciách pod tými, ktoré boli testované, mali by byť uvedené poznámky o tom, že merania referujú o koncentráciách testovanej látky v roztoku,

— charakteristiky zrieďovacej vody: pH, tvrdosť vody, teplota, koncentrácia rozpusteného kyslíka, úroveň zostatkového chlóru (ak bola zmeraná), celkový organický uhlík, suspendované látky, salinita v testovanom prostredí (ak bol meraný) a iné vykonané merania,

— kvalita vody v testovaných nádobách: pH, tvrdosť vody, teplota a koncentrácia rozpusteného kyslíka.

2.3.4. **Výsledky:**

— výsledky z predbežných štúdií stability testovanej látky,

— záznamy, že v kontrolných nádobách boli splnené požiadavky na akceptovanie úhrnného prežívania testovaných druhov počas testu (dodatok 2 a 3),

— dátum úmrtia alebo prežitia v embryonálnom a larválnom štádiu a úhrnná úmrtnosť alebo prežitie,

— deň vyliahnutia a počet vyliahnutých jedincov,

— údaje o dĺžke (a hmotnosti),

— rozsah a opis morfologických abnormalít, ak sa nejaké vyskytli,

— rozsah a opis účinkov na správanie, ak sa nejaké vyskytli,

— štatistická analýza a spracovanie údajov

— pri testoch analyzovaných za použitia ANOVA metódy – najnižšie zistená účinná koncentrácia (LOEC) pri p = 0,05/a nezistená účinná koncentrácia (NOEC) pri predpokladanom účinku, zahŕňajúca popis štatistických postupov a predpoklad, aký veľký účinok je možné detegovať,

▼B

— pri testoch analyzovaných regresnými technikami LC/ECx a intervaly spoľahlivosti, grafy preložených modelov, ktoré boli použité na ich výpočty,

— vysvetlenie pri všetkých odchýlkach od tejto testovacej metódy.

3. **POUŽITÁ LITERATÚRA**

(1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 pp. June 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 s.

(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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 129 – 145.

(10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 s.

(12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, s. 1096 – 1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, s. 482 – 491.

(14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J.G (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

(15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp. 321 – 334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, 81 s.

(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, s. 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 S an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: s. 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, s. 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, s. 1189 – 1203.

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E. K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 s.

(25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, pp. 1 – 58.

Tabuľka 1A

Odporučené druhy rýb na testovanie

Sladkovodné ryby
Oncorhynchus mykiss Pstruh dúhový (9)(16)
Danio rerio Zebrička(7)(17)(18)
Cyprinus caprio Kapor obyčajný (8)(19)
Oryzias latipes Ryžová rybka/Medaka (20)(21)
Pimephales promelas Fathead minnow (8)(22) – malá kaprovitá ryba

▼B

Tabuľka 1B

Príklady iných dobre zdokumentovaných druhov rýb, ktoré sa tiež používajú na testovanie

SLADKOVODNÉ RYBY	MORSKÉ RYBY
Carassius auratus Karas zlatý (8)	*Menidia peninsulae* Tidewater silverside – malá morská ryba druhu Menidia peninsulae (23)(24)(25)
Lepomis macrochirus Pleskáč silný (8)	*Clupea harensus* Sleď druhu Clupea harengus (24)(25)
	Gadus morhua Treska druhu *Gadus morhua* (24)(25)
	Cyprinodon variesatus Sheepshead minnow – malá morská ryba druhu Cyprinodon variegatus (23)(24)(25)

▼B

DODATOK 1

NÁVOD NA VYKONANIE TESTU TOXICITY NA EMBRYÁCH A PLODOVOM VAKU – POTERI U ZEBRIČIEK *(Brachydanio rerio)*

ÚVOD

Zebrička pochádza z Koromandelského pobrežia v Indii, kde osídľuje rýchlo prúdiace toky. Je to bežná akvarijná rybka z rodu kaprovitých a informácie ojej ošetrovaní a chovaní možno nájsť v študijných príručkách o tropických rybách. Ich biológiu a použitie vo výskume rýb vo svoje práci popísal Laaleom (1).

Ryba výnimočne dosahuje dĺžku 45 mm. Telo má valcovité so 7 – 9 tmavomodrými striebristými pásikmi. Tieto pásiky sa tiahnu od chrbtovej po análnu plutvu. Chrbát je olivovo-zelený. Samčekovia sú štíhlejší ako samičky. Samičky sú striebristej ši e a ich bruško je vyduté, predovšetkým pred trením.

Dospelé ryby sú schopné znášať veľké rozdiely v teplote, pH a tvrdosti vody. Aby sme však získali zdravé ryby, ktoré produkujú vajíčka dobrej kvality, je potrebné dodržiavať optimálne podmienky.

Počas trenia samček zachytí samičku a spojí sa s ňou, táto potom vypudí oplodnené vajíčka. Vajíčka, ktoré sú priehľadné a nepriľnavé, padajú na dno, kde ich môžu ich rodičia zožrať. Na ich trenie má vplyv svetlo. Ak je ranné svetlo dostatočné, ryby sa trú v skorých ranných hodinách, hneď po úsvite.

Samičky môžu v týždenných intervaloch vyprodukovať sériu niekoľkých stoviek vajíčok.

PODMIENKY PRE RODIČOVSKÉ RYBY, REPRODUKČNÉ RYBY A VÝVOJOVÉ ŠTÁDIÁ ŽIVOTA RÝB

Vyberte vhodný počet zdravých rýb a držte ich v príslušnej kvalite (napr. dodatok 4) najmenej dva týždne pred očakávaným trením. Skupine rýb by sa malo umožniť vytrieť najmenej raz pred vyprodukovaním série vajíčok prežitých v teste. Hustota rýb počas tohto obdobia by nemala presiahnuť 1 gram ryby na liter vody. Ak sa pravidelne vymieňa voda alebo sa používajú systémy na čistenie vody, potom môže byť hustota rýb vyššia. Je potrebné udržiavať stálu teplotu v chovných nádržiach a to hodnoty 25 ^{o}C ± 2 ^{o}C. Ryby sa kŕmia rôznou potravou, ktorá môže pozostávať napríklad z komerčnej suchej potravy, živých, čerstvo vyliahnutých Arthémií, chironomných dafnií, bielych červov (Enchytraeid).

Dva postupy, ktoré sú uvedené nižšie, v praxi vedú k získaniu dostatočného množstva zdravých oplodnených vajíčok použiteľných na test:

i) Osem samičiek a 16 samčekov sa umiestni do nádrže obsahujúcej 50 l zrieďovacej vody, zabezpečia sa pred priamym svetlom a nechajú sa neručene najmenej 48 hodín. Trecia podložka je umiestnená na dno akvária poobede, deň pred štartom testu. Trecí tanier pozostáva z rámu (z plexiskla alebo iného vhodného materiálu), výšky 5 – 7 cm s hrubou sieťovinou 2 – 5 mm veľkosť oka, zachytenou na vrchu s jemnou sieťovinou s 10 – 30 μm veľkosť oka na dne. Počet „trecích stromov“, pozostávajúcich z netočiacich sa nylonových laniek, je uchytených na hrubej sieťovine v ráme. Potom, čo ryby boli držané 12 hodín v tme, zažneme slabé svetlo, ktoré iniciuje trenie. Trecí tanier je po dvoch až štyroch hodinách po trení odstránený spolu so zozbieranými vajíčkami. Trecí tanier zabraňuje rybám požierať vajíčka a súčasne dovoľuje ľahký zber vajíčok. Skupine rýb by sa mala vytrieť najmenej raz pred trením, z ktorého vajíčka budú použité v teste.

▼B

ii) Od 5 do 10 samcov a samičiek rýb je individuálne držaných najmenej dva týždne pred zamýšľaným trením. Po 5 – 10 dňoch budú bruška samičiek vypuklé a ich genitálne papily budú viditeľné. Samčeky sú bez papíl. Trenie sa uskutoční v trecích nádržiach vybavených falošným sieťovaným dnom (ako bolo popísané vyššie). Nádrž je naplnená zrieďovacou vodou tak, že hĺbka vody nad sieťou je 5 – 10 cm. Jedna samička a dvaja samčekovia sú umiestnení do nádrže jeden deň pred zamýšľaným trením. Teplotu vody postupne zvyšujeme na teplotu o 1 stupeň vyššiu ako bola aklimatizačná teplota. Svetlo je vypnuté a nádrž zostáva ničím nerušená. Ráno je zapnuté slabé svetlo, ktoré vyvolá trenie. Po 2 – 4 hodinách sú ryby odstránené a vajíčka sa zozbierajú. Ak je potrebné získať od jednej samičky veľký počet sérií vajíčok, potom sa pripraví dostatočný počet paralelných trecích nádrží. Podľa záznamov o reprodukčných výsledkoch jednotlivých samičiek pred testom (veľkosť série a kvalita), môžu byť tieto samičky s najvyššou reprodukciou vybrané ako chovné.

Vajíčka by mali byť prenesené do testovacích nádob sklenenými trubicami/vnútorný priemer nie menší ako 4 mm/vybavené sacou bankou – balónikom. Množstvo vody obklopujúce prenášané vajíčka má byť čo najmenšie. Vajíčka sú ťažšie ako voda a vypadávajú z trubky. Vajíčka (larvy) je potrebné chrániť pred stykom so vzduchom. Mikroskopické skúmanie vzoriek zo sérií má dbať na to, aby sa nevyskytli žiadne neregulárnosti v prvom vývojovom štádiu. Dezinfekcia vajíčok nieje povolená.

Miera úmrtnosti vajíčok je najvyššia v prvých 24 hodinách po oplodnení. Počas tohto obdobia je vždy vykazovaná mortalita 5 – 40 %. Degenerujúce vajíčka sú výsledkom neúspešného oplodnenia alebo vývojových porúch. Zdá sa, že série vajíčok závisia od samičky ryby, tak ako niektoré samičky sústavne produkujú vajíčka dolnej kvality, iné nikdy. Tiež vývojový pomer a miera liahnutia sa mení od jednej série ku druhej. Úspešne oplodnené vajíčko a žĺtkový vačok lariev prežívajú dobre, normálne okolo 90 %. Pri 25 ^{o}C vajíčka sa vyliahnu 3 – 5 dní po oplodnení a žĺtkový vačok sa absorbuje priebežne do 13 dní po oplodnení.

Embryonálny vývoj bol veľmi dobre definovaný Hisaokom a Batťlom (2). Cestou priehľadnosti vajíčok a počtom vyliahnutých lariev môžeme sledovať vývoj rýb a zistiť prítomnosť malformácií. Približne po štyroch hodinách od oplodnenia je možné odlíšiť neoplodnené vajíčka od oplodnených (3). Pri tomto testovaní sú vajíčka a larvy umiestnené do testovacích nádob s malým objemom a sú skúmané pod mikroskopom.

Testované podmienky, ktoré uplatňujeme na ranné štádiá života, sú v zozname v dodatku 2. Optimálne hodnoty pH a tvrdosť zrieďovacej vody sú pH 7,8 a 250 mg $CaCO_3$/l.

VÝPOČTY A ŠTATISTIKA

Navrhuje sa dvojfázový prístup. Po prvé, údaje o úmrtnosti, abnormálnom vývoji a čase liahnutia sa štatisticky analyzujú. Ak pri koncentráciách nebol detegovaný žiadny účinok, štatisticky sa vyhodnotí dĺžka tela. Tento prístup je vhodný, ak toxická látka môže selektívne zabíjať malé ryby, zadržať čas liahnutia a vyvolávať všeobecné malformácie, takže vedú k meraniam dĺžky s odchýlkami. Okrem toho, zmeria sa približne rovnaký počet rýb pre každý spôsob spracovania, aby sa zabezpečila validita štatistiky daného testu.

▼B

STANOVENIE LC_{50} A EC_{50}

Percento prežívajúcich vajíčok a lariev sa vypočíta a koriguje vzhľadom na mortalitu v kontrolnom stanovení podľa Abbottovho vzorca (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P}{C} \times 100\right)$$

kde:

P = korigované % prežívajúcich

P' = % prežívajúcich zistené pri testovanej koncentrácii

C = prežívajúce pri kontrolnom stanovení

Ak je to možné, LC_{50} sa stanoví vhodnou metódou na konci testu.

Ak sa vyžaduje zahrnutie morfologických abnormalít do štatistiky pre EC_{50}, potom návod môžeme nájsť v Stephanovi (5).

ODHAD LOEC A NOEC

Objektívny test vajíčok a plodový vak – poter porovnávaný s nenulovou koncentráciou pri kontrolnom stanovení – stanoví sa LOEC. Z toho dôvodu môžu byť užitočné násobné porovnávacie postupy (6), (7), (8), (9), (10).

POUŽITÁ LITERATÚRA

(1) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (Brachydanio rerio) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, s. 121 – 173.

(2) Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish Brachydanio rerio (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 s.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, s. 173 – 181.

(4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1 – 333.

(5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, s. 69 – 81.

(6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, s. 1096 – 1121.

(7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482 – 491.

(8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, s. 103 – 117.

(9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, s. 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.

DODATOK 2

PODMIENKY A TRVANIE TESTU A KRITÉRIÁ NA PREŽITIE U ODPORUČENÝCH DRUHOV RÝB

Druh rýb	Teplota (°C)	Obsah solí (0/00)	Fotoperióda (hod.)	Trvanie štádia (DNI)		Typická dĺžka testu	Zostatok po kontrole (minimum prežitých %)	
				Embryo	Plodový vačok – poter		Úspešne vyliahnuté	Po vyliahnutí
SLADKOVODNÉ								
Bracydanio rerio Zebrička	25 ± 1	—	12 – 16	3 – 5	8 – 10	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 5 dní po vyliahnutí (8 – 10 dní)	80	90
Oncorhynchus mykiss Pstruh dúhový	10 ± 1 ([1]) 12 ± 1 ([2])	—	0 ([a])	30 – 35	25 – 30	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 20 dní po vyliahnutí (50 – 55 dní)	66	70
Cyprinus carpio Kapor obyčajný	21 – 25	—	12 – 16	5	> 4	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 4 dní po vyliahnutí (8 – 9 dní)	80	75
Oryzias latipes Ružová rybka/Medaka	24 ± 1 ([1]) 23 ± 1 ([2])	—	12 – 16	8 – 11	4 – 8	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 5 dní po vyliahnutí (13 – 16 dní)	80	80
Pimephales promelas Fathead minnow – malá kaprovitá ryba	25 ± 2	—	16	4 – 5	5	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 4 dní po vyliahnutí (8 – 9 dní)	60	70

([1]) U embrií.
([2]) U lariev.
([a]) Embryá a larvy sa musia až do obdobia jedného týždňa po vyliahnutí držať v tme (mimo kontrolných časov). Počas trvania testu sa držia pri tlmenom osvetlení.

▼B

DODATOK 3

Podmienky a trvanie testu a kritériá na prežitie u ostatných dobre zdokumentovaných druhov rýb

Druh rýb	Tepl ota (°C)	Obsah soli (0/00)	Foto perióda (hod.)	Trvanie štádia (dni)		Typická dĺžka testu	Zostatok po kontrole (minimum prežitých %)	
				Embryo	Plodový vačok – poter		Úspešne vyliahnuté	Po vyliahnutí
SLADKOVODNÉ RYBY								
Carassius auratus Karas zlatý	24 ± 1	—	—	3 – 4	> 4	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 4 dní po vyliahnutí (7 dní)	—	80
Leopomis macrochirus Pleskáč silný	21 ± 1	—	16	3	> 4	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 4 dní po vyliahnutí (7 dní)	—	75
MORSKÉ RYBY								
Menidia peninsulae Tidewater silverside – malá morská ryba	22 – 25	15 – 22	12	1,5	10	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 5 dní po vyliahnutí (6 – 7 dní)	80	60
Clupea harengus Sleď druhu	10 ± 1	8 – 15	12	20 – 25	3 – 5	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 3 dní po vyliahnutí (23 – 27 dní)	60	80
Gadus morhua Treska druhu	5 ± 1	5 – 30	12	14 – 16	3 – 5	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 3 dní po vyliahnutí (18 dní)	60	80
Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow – malá morská ryba druhu	25 ± 1	15 – 30	12	—	—	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 4/7 dní po vyliahnutí (28 dní)	> 75	80

▼B

DODATOK 4

NIEKTORÉ CHARAKTERISTIKY VODY VHODNEJ NA RIEDENIE

LÁTKA	KONCENTRÁCIE
Látka v časticiach	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Zlúčený amoniak	< 1 µg/l
Zostatkový chlór	< 10 µg/l
Celkové organofosfátové pesticídy	< 50 ng/l
Celkové organochlórované pesticídy plus polychlórované bifenyly	< 50 ng/1
Celkový organický chlór	< 25 ng/1

▼B

C.16. VČELY OBECNÉ – AKÚTNY TEST ORÁLNEJ TOXICITY

1. METÓDA

Táto metóda akútneho toxikologického testu je totožná s metódou OECD TG 213 (1998)

1.1. ÚVOD

Tento toxikologický test je laboratórna metóda navrhnutá na stanovenie orálnej akútnej toxicity aplikovaných chemických látok pri ochrane dospelých včiel robotníc.

Pri stanovení a vyhodnocovaní toxických charakteristík látok sa určenie akútnej a orálnej toxicity u včiel môže požadovať všade tam, kde je napr. možná expozícia včiel danou chemikáliou. Akútny orálny test toxicity sa vykonáva s cieľom zistenia vrodenej toxicity pesticídov a iných chemikálii voči včelám. Výsledky testu je možné použiť na definovanie potreby na následné vyhodnotenie. Túto metódu je možné použiť najmä v postupných krokových – odborných programoch, zameraných na zistenie nebezpečenstva vplyvu pesticídov na včely, založených na postupnom progrese od laboratórnych testov toxicity cez semipoľné až ku poľným – terénnym pokusom (1). Pesticídy môžu byť testované ako aktívne látky (a. s.) alebo ako viazané produkty.

Toxický štandard sa dá použiť na overenie citlivosti včiel a presnosť testovacieho postupu.

1.2. DEFINÍCIE

Akútna orálna toxicita: sú nepriaznivé účinky, ktoré sa dostavia maximálne do 96 hodín po orálnom podaní jednej dávky testovanej látky.

Dávka: je množstvo skonzumovanej testovanej látky a je vyjadrená ako hmotnosť (ug) testovanej látky na testovaného živočícha (µg/včelu). Skutočná dávka sa nedá vypočítať pre každú včelu individuálne vzhľadom na spoločné kŕmenie, ale je možné vyjadriť priemernú dávku (celkovo skonzumovaná testovaná látka/počet testovaných včiel v jednom úli).

LD_{50} (stredná letálna dávka) orálna: je štatisticky odvodená hodnota jednej dávky látky, po ktorej dochádza k úhynu 50 % testovaných živočíchov po podaní orálnou cestou. Hodnota LD_{50} je vyjadrená v (µg) testovanej látky na včelu. Pre pesticídy môže byť testovaná látka aj v aktívnej forme (a. s.), ale aj vo forme viazanej, a to ako produkt obsahujúci viac ako jednu účinnú látku.

Mortalita: úhyn živočícha sa konštatuje v prípade jeho kompletnej imobility.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Dospelé robotnice včiel obecných (*Apis mellifera)* sú vystavené celému radu dávok testovanej látky, ktorá je rozptýlená v roztoku sacharózy. Potom sa včely kŕmia rovnakou stravou, ktorá neobsahuje testovanú látku. Úmrtnosť sa zaznamenáva denne najmenej 48 hodín a porovnáva sa s kontrolnými hodnotami. Ak sa úmrtnosť zvýši medzi 24 až 48 hodinami, kým kontrolná úroveň úmrtnosti zostáva na akceptovateľnej hladine, t. j. menej alebo rovných 10 %, je vhodné predĺžiť trvanie testu maximálne na 96 hodín. Výsledky sa analyzujú, aby sa mohla vypočítať hodnota LD_{50} za 24 hodín a 48 hodín a v prípade predĺženia štúdie aj za 72 hodín a 96 hodín.

▼B

1.4. VALIDITA TESTU

Ak má byť test platný, musia platiť nasledovné podmienky:

— priemerná úmrtnosť na celkový počet kontrol nesmie prekročiť 10 % na konci testu,

— hodnota LD_{50} toxického štandardu musí spĺňať špecifikovaný rozsah.

1.5. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.5.1. **Výber včiel**

Mali by sa použiť mladé robotnice rovnakého druhu (t. j. včely rovnakého veku, včely rovnako stravované, atď. Včely by sa mali odobrať z primeraného kŕmeného, zdravého chovu a ak je to možné, z chovu nezasiahnutého chorobami a z kolónie s kráľovnou s overeným pôvodom a fyziologickým stavom. Včely by sa mali vyberať ráno pred použitím alebo večer pred testovacím dňom a potom by sa mali udržiavať v týchto podmienkach až do nasledujúceho dňa. Vhodné sú včely odobrané z rámov, bez mláďat. Malo by sa vyvarovať odoberaniu včiel skoro na jar alebo neskoro na jeseň, keďže v tomto období sa včelám mení ich fyziológia. V prípade, že sa predsa test musí vykonať počas skorej jari alebo neskorej jesene, včely môžu byť v prípade núdze premiestnené do inkubátora a počas jedného týždňa sa budú kŕmiť včelím chlebom (peľ zozbieraný z plástov) a roztokom sacharózy. Včely liečené chemickými látkami ako sú antibiotiká, antivarroa produktmi, atď. by sa nemali použiť na toxikologický test po dobu štyroch týždňov od poslednej liečby.

1.5.2. **Podmienky kŕmenia a chovu včiel**

Vhodné sú úle s ľahkým čistením a dobrým vetraním. Je možné použiť ľubovoľný vhodný materiál ako je napr.: nehrdzavejúca oceľ, pletivo, plastické alebo drevené úle. Je vhodné umiestniť skupinu 10 včiel do jedného úľa. Veľkosť testovacích úľov by mala byť úmerná počtu včiel, t. j. aby bol zabezpečený dostatočný priestor.

Včely sa majú držať v tme, v miestnosti určenej na pokusy pri teplote 25 ± 2 °C. Relatívna vlhkosť, normálne okolo 50 – 70 %, by mala byť zaznamenávaná počas doby trvania testu. Manipulovanie vrátane liečby a pozorovania sa môžu uskutočňovať za denného svetla. Ako potrava sa použije roztok sacharózy vo vode s konečnou koncentráciou 500 g/l (50 % objemových). Po podaní testovacích dávok by sa mala strava podávať *ad libitum*. Spôsob kŕmenia by mal umožňovať zaznamenanie podávanej stravy pre každý testovací úľ (pozri časť 1.6.3.1). Je možné použiť sklenenú trubicu (približne 50 mm dlhú a 10 mm širokú s otvoreným zúženým koncom okolo 2 mm v priemere)

1.5.3. **Príprava včiel**

Zozbierané včely sú náhodne rozmiestnené do testovacích úľov, ktoré sú náhodne rozmiestnené v experimentálnej miestnosti.

▼B

Pred začatím testu by sa mali včely nechať vyhladovať aspoň dve hodiny pred začiatkom testu. Odporúča sa, aby včely neprijímali potravu, t. j. aby ich obsah čriev pred začatím testu bol rovnaký. Umierajúce včely je pred začiatkom testu potrebné nahradiť zdravými.

1.5.4. **Príprava dávok**

Ak je testovaná látka miešateľná s vodou, môže sa rozptýliť priamo v 50 % roztoku sacharózy. V prípade technických produktov a látok s nízkou rozpustnosťou vo vode, akými sú napríklad organické rozpúšťadlá, emulsifikátory alebo disperzné činidlá s nízkou toxicitou na včely môže byť použitý napr. acetón, dimethylformamid, dimetylsulfoxid. Koncentrácia rozpúšťadla závisí od rozpustnosti testovanej látky a mala by byť rovnaká pre všetky testované koncentrácie. Aj keď koncentrácia rozpúšťadla o hodnote 1 % je v zásade prijateľná, nemala by sa prekročiť.

Mali by sa pripraviť vhodné kontrolné roztoky, t. j. roztoky, v ktorých rozpúšťadlo alebo disperzné činidlo rozpustí testovanú látku. Použijú sa dve oddelené kontrolné skupiny: vodný roztok a sacharózový roztok rozpúšťadlom/nosičom v koncentrácii použitej v dávkovacích roztokoch.

1.6. POSTUP

1.6.1. **Test a kontrolné skupiny**

Počet dávok a ich opakovaní by mal spĺňať štatistické požiadavky na stanovenie LD_{50} s 95 % pravdepodobnosťou. Bežne sa pre tento test požaduje päť dávok v geometrickom rade s faktorom nepresahujúcim 2,2 pre daný rozsah LD_{50}. Zrieďovací faktor a počet dávkovaní rôznych koncentrácií sa musí stanoviť vo vzťahu ku strmosti krivky toxicity (dávka versus úmrtnosť), je potrebné vziať do úvahy štatistickú metódu, ktorá bola zvolená na analýzu výsledkov. Výber rozsahu pre test umožní vybrať vhodné koncentrácie dávkovanej látky.

Minimálne tri testovacie skupiny, každá po desiatich včelách, by mali byť kŕmené testovanou látkou na každú skúmanú koncentráciu. Minimálne tri kontrolné skupiny, každá po desiatich včelách, by mali prebiehať súbežne s testovanými sériami. Kontrolné skupiny by mali byť tiež zaradené pre použité rozpúšťadlo/nosič (pozri časť 1.5.4).

1.6.2. **Toxický štandard**

Do testovacích sérií je potrebné zahrnúť toxický štandard. Následne sa vyselektujú aspoň tri dávky, aby sa dosiahla očakávaná hodnota LD_{50}. Pri každej testovanej dávke by sa mali použiť minimálne tri úle, každý po desiatich včelách. Preferovaný štandard toxicity je dimetoát, pre ktorý je zaznamenaná hodnota LD_{50} za 24 hodín v rozmedzí 0,10 – 0,35 μg a. s. /včelu (2). Aj iné štandardy toxicity budú akceptovateľné tam, kde sa dá získať dostatočné množstvo údajov na overenie očakávanej odozvy dávky (napr. parathion).

▼B

1.6.3. **Expozícia**

1.6.3.1 *Podávanie dávok*

Každej testovanej skupine včiel sa bude podávať 100 – 200 µl vodného roztoku 50 % sacharózy, ktorý obsahuje testovanú látku primeranej koncentrácie. V prípade látok s nízkou rozpustnosťou, nízkou toxicitou alebo nízkou koncentráciou vo viazanej forme sa vyžaduje väčšie množstvo testovanej látky v sacharózovom roztoku. Skonzumované množstvo potravy je potrebné monitorovať u každej skupiny včiel. Ak je krmivo s testovanou látkou skŕmené (obyčajne v intervale 3 – 4 hodín), zvyšok krmiva sa z testovacieho úľa odoberie a nahradí sa krmivom obsahujúcim iba sacharózový roztok. Sacharózový roztok sa potom podáva *ad libitum*. Pri niektorých zlúčeninách podávaných vo vyšších koncentráciách sa môže prejaviť znížené alebo žiadne prijímanie potravy ako dôsledok zvýšenej koncentrácie. Po maximálne 6 hodinách sa neskonzumované krmivo odoberie a nahradí roztokom sacharózy. Množstvo skonzumovanej potravy sa zaznamená (meranie objemu/hmotnosť zostatkovej potravy).

1.6.3.2. *Trvanie testu*

Na trvanie testu sa uprednostňuje doba 48 hodín, po ktorej sa testovaný roztok nahradí samotným roztokom sacharózy. Ak vzostup úmrtnosti včiel pokračuje a prekročí hodnotu 10 % počas prvých 24 hodín, trvanie testu by malo byť predĺžené na maximálne 96 hodín, za predpokladu, že kontrola úmrtnosti včiel neprekročí 10 %.

1.6.4. **Pozorovania**

Úmrtnosť sa zaznamenáva po 4 hodinách od začiatku testu a potom po 24 hodinách a po 48 hodinách (po podaní testovacej dávky). Ak je potrebný predĺžený čas pozorovania, ďalšie hodnotenie by malo prebehnúť v 24 hodinových intervaloch, avšak maximálne do celkových 96 hodín na dôkaz toho, že úmrtnosť včiel neprekročí stanovených 10 %.

Je potrebné zaznamenať aj množstvo skonzumovanej testovacej látky na skupinu včiel. Porovnaním hodnôt skonzumovanej a neskonzumovanej potravy počas 6 hodín sa získajú informácie o stráviteľnosti poskytnutej potravy.

Všetky abnormálne prejavy správania sa včiel počas testovaného obdobia by mali byť zaznamenané.

1.6.5. **Limitný test**

V niektorých prípadoch (napr. za predpokladu, že testovaná látka má nízku toxicitu) je možné vykonať limitný test 100 µg a. s. /včelu s cieľom dokázať, že hodnota LD_{50} je väčšia ako uvedená hodnota. Rovnaký postup by sa mal použiť vrátane troch opakovaní testu na danú testovanú látku, aj na relevantnú kontrolu, na zistenie množstva skonzumovanej potravy a pri použití toxických štandardov. V prípade mortality sa celá štúdia prepracuje. Ak sa spozorujú subletálne účinky (pozri časť 1.6.4.), aj tieto je potrebné zaznamenať.

▼B

2. **ÚDAJE A SPRÁVA**

2.1. ÚDAJE

Údaje sa zosumarizujú do tabuľkovej formy, pre každú pokusnú skupinu zvlášť, tak isto aj pre kontrolnú skupinu včiel a skupinu použitú na zistenie toxického štandardu, pre počet použitých včiel, úmrtnosť v každom období pozorovania a pre počet včiel so zmeneným správaním. Údaje mortality je potrebné analyzovať vhodnými štatistickými metódami (napr. probitová analýza, pohyblivý priemer, binominálna pravdepodobnosť) (3), (4). Grafické záznamy dávok a ich odoziev by mali byť zaznamenané formou kriviek, a to v každý odporúčaný čas pozorovania na výpočet sklonu strmosti kriviek a stredných smrteľných dávok (LD_{50}) s 95 % pravdepodobnostnými limitami. Opravy týkajúce sa kontroly úmrtnosti sa vykonajú za pomoci Abbottových korekcií (4), (5). Tam, kde nebola úplne skonzumovaná použitá potrava, zaznamenajú sa skonzumované testovacie dávky na skupinu včiel. Hodnota LD_{50} by mala byť vyjadrená v μg testovanej látky na včelu.

2.2. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať nasledujúce informácie:

2.2.1. **Testované látky:**

— fyzikálna podstata a relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti (ako napr.: stabilita – odolnosť vo vode, tlak pár),

— identifikačné chemické údaje, vrátane štruktúrneho vzorca, čistota (napr. pesticídov, identitu a koncentráciu účinnej látky alebo látok).

2.2.2. **Testované druhy:**

— odborný názov, druh, približný vek (v týždňoch), metóda zberu, dátum zberu,

— informácie o kolónach použitých na zber testovaných včiel, vrátane zdravotného stavu, všetkých chorôb týkajúcich sa dospelého včelstva, všetky preliečenia, atď.

2.2.3. **Podmienky testu**

— teplota a relatívna vlhkosť experimentálnej miestnosti,

— podmienky chovu včiel, vrátane typu, veľkosti a materiálu testovacích úľov,

— metóda prípravy zásobných roztokov a frekvencia prípravy nových roztokov (rozpúšťaná látka a jej koncentrácia sa musí v prípade použitia uviesť),

— koncepcia testu, napr. použitý počet a testovacie koncentrácie, počet kontrol pre každú testovanú koncentráciu a kontrolu, počet kópií testovacích úľov a počet včiel na testovaný úľ,

— dátum testu.

▼B

2.2.4. **Výsledky:**

— výsledky predbežného výberu rozsahu štúdie, ak bol výber uskutočnený,

— nespracované údaje: úmrtnosť pri každej testovanej dávke, pri každom pozorovanom čase,

— graf udávajúci závislosť, dávka a odozva na konci každého testu,

— hodnoty LD_{50} s 95 % pravdepodobnosťou limitu pre každý odporúčaný čas pozorovania, pre testovanú látku a toxický štandard,

— štatistické postupy použité na určenie LD_{50},

— úmrtnosť pri kontrolách,

— iné biologické dopady pozorované alebo merané, ako napr.: abnormálne správanie sa včiel (vrátane odmietnutia testovacej dávky potravy), pomer skonzumovanej potravy v skupinách včiel testovaných a netestovaných,

— akékoľvek odchýlky od testovacích postupov tu uvedených a všetky dostupné, relevantné informácie.

3. **POUŽITÁ LITERATÚRA:**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision – Making Scheme for the Enviromental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO Bulletin, Vol.23, N.1, s. 151 – 165. March 1993.

(2) Gough, H.J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B.(1994). The use of dimethoat as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981 – 1992. Journal of Apicultural Research, 22, s. 119 – 125

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method ef evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., pp. 99 – 113

(4) Finney, D.J. (1971). Probit analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York

(5) Abbott, W.S.(1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, s. 265 – 267.

▼B

C.17. VČELY OBECNÉ – AKÚTNY TEST TOXICITY KONTAKTOM

1. METÓDA

Táto metóda akútneho toxikologického testu je totožná s metódou OECD TG 214 (1998).

1.1. ÚVOD

Tento toxikologický test je laboratórna metóda navrhnutá na stanovenie orálnej akútnej toxicity aplikovaných chemických látok pri ochrane dospelých včiel robotníc.

Pri stanovení a vyhodnocovaní toxických charakteristík látok sa určenie akútnej a orálnej toxicity u včiel môže požadovať všade tam, kde je napr. možná expozícia včiel danou chemikáliou. Akútny orálny test toxicity sa vykonáva s cieľom zistenia vrodenej toxicity pesticídov a iných chemikálii voči včelám. Výsledky testu je možné použiť na definovanie potreby na následné vyhodnotenie. Túto metódu je možné použiť najmä v postupných krokových – odborných programoch, zameraných na zistenie nebezpečenstva vplyvu pesticídov na včely, založených na postupnom progrese od laboratórnych testov toxicity cez semipoľné až ku poľným – terénnym pokusom (1). Pesticídy môžu byť testované ako aktívne látky (a. s.) alebo ako viazané produkty.

Toxický štandard sa dá použiť na overenie citlivosti včiel a presnosť testovacieho postupu.

1.2. DEFINÍCIE

Akútna orálna toxicita: sú nepriaznivé účinky, ktoré sa dostavia maximálne do 96 hodín po lokálnej aplikácií jednej dávky testovanej látky.

Dávka: je množstvo skonzumovanej testovanej látky a je vyjadrená ako hmotnosť (μg) testovanej látky na testovaného živočícha (μg/včelu).

LD_{50} (stredná letálna dávka): je štatisticky odvodená hodnota jednej dávky látky, po ktorej dochádza k úhynu 50 % testovaných živočíchov pri kontakte s látkou. Hodnota LD_{50} je vyjadrená v (μg) testovanej látky na včelu. U pesticídov môže byť testovaná látka aj v aktívnej forme (a. s.), ale aj vo forme viazanej, a to ako produkt obsahujúci viac ako jednu účinnú látku.

Mortalita: úhyn živočícha sa konštatuje v prípade jeho kompletnej imobility.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Dospelé robotnice včiel obecných *(Apis mellifera)* sú vystavené celému radu dávok testovanej látky, ktorá je rozpustená vo vhodnom nosiči, priamou aplikáciou do thoraxu (kvapôčky). Dĺžka trvania testu je 24 hodín. Potom sa včely kŕmia rovnakou stravou, ktorá neobsahuje testovanú látku. Ak sa úmrtnosť zvýši medzi 24 až 48 hodinami, kým kontrolná úroveň úmrtnosti zostáva na akceptovateľnej hladine, t. j. menej alebo rovných 10 %, je vhodné predĺžiť trvanie testu maximálne na 96 hodín. Výsledky sa analyzujú, aby sa mohla vypočítať hodnota LD_{50} za 24 hodín a 48 hodín a v prípade predĺženia štúdie aj za 72 hodín a 96 hodín.

▼B

1.4. VALIDITA TESTU

Ak má byť test platný, musia platiť nasledovné podmienky:

— priemerná úmrtnosť na celkový počet kontrol nesmie prekročiť 10 % na konci testu,

— hodnota LD_{50} toxického štandardu musí spĺňať špecifikovaný rozsah.

1.5. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.5.1. **Výber včiel**

Mali by sa použiť mladé robotnice rovnakého druhu (t. j. včely rovnakého veku, včely rovnako stravované, atď. Včely by sa mali odobrať z primeraného kŕmeného, zdravého chovu a ak je to možné, z chovu nezasiahnutého chorobami a z kolónie s kráľovnou s overeným pôvodom a fyziologickým stavom. Včely by sa mali vyberať ráno pred použitím alebo večer pred testovacím dňom a potom by sa mali udržiavať v týchto podmienkach až do nasledujúceho dňa. Vhodné sú včely odobrané z rámov, bez mláďat. Malo by sa vyvarovať odoberaniu včiel skoro na jar alebo neskoro na jeseň, keďže v tomto období sa včelám mení ich fyziológia. V prípade, že sa predsa test musí vykonať počas skorej jari alebo neskorej jesene, včely môžu byť v prípade núdze premiestnené do inkubátora a počas jedného týždňa sa budú kŕmiť včelím chlebom (peľ zozbieraný z plástov) a roztokom sacharózy. Včely liečené chemickými látkami ako sú antibiotiká, antivarroa produktmi, atď. by sa nemali použiť na toxikologický test po dobu štyroch týždňov od poslednej liečby.

1.5.2. **Podmienky kŕmenia a chovu včiel**

Vhodné sú úle s ľahkým čistením a dobrým vetraním. Je možné použiť ľubovoľný vhodný materiál, ako je napr.: nehrdzavejúca oceľ, pletivo, plastické alebo drevené úle. Je vhodné umiestniť skupinu 10 včiel do jedného úľa. Veľkosť testovacích úľov by mala byť úmerná počtu včiel, t. j. aby bol zabezpečený dostatočný priestor.

Včely sa majú držať v tme, v miestnosti určenej na pokusy pri teplote 25 ± 2 °C. Relatívna vlhkosť, normálne okolo 50 – 70 %, by mala byť zaznamenávaná počas doby trvania testu. Manipulovanie vrátane liečby a pozorovania sa môžu uskutočňovať za denného svetla. Ako potrava sa použije roztok sacharózy vo vode s konečnou koncentráciou 500 g/l (50 % objemových). Po podaní testovacích dávok by sa mala strava podávať *ad libitum* s použitím včelieho kŕmidla. Je možné použiť sklenenú trubicu (približne 50 mm dlhú a 10 mm širokú s otvoreným zúženým koncom okolo 2 mm v priemere)

1.5.3. **Príprava včiel**

Zozbierané včely sa znecitlivejú použitím oxidu uhličitého alebo dusíka pri každej aplikácií testovanej látky. Je potrebné minimalizovať nielen množstvo použitého anestetika, ale aj časť expozície. Umierajúce včely je pred začiatkom testu potrebné nahradiť zdravými.

1.5.4. **Príprava dávok**

Testovanú látku je možné aplikovať ako roztok na nosiči, t. j. organické rozpúšťadlo alebo vodný roztok so zvlhčujúcim činidlom. Ako organické rozpúšťadlo sa používa acetón, ale je možné použiť aj iné organické rozpúšťadlá s nízkou toxicitou voči včelám (napr. dimeťnylformamid, dimetylsulfoxid). Pri vo vode rozpustných viazaných produktoch a vysoko polárnych organických zlúčeninách nerozpustných v organických nosičových rozpúšťadlách je lepšie použiť slabé roztoky komerčne dostupných zvlhčujúcich činidiel na ľahšiu aplikáciu (napr. Agral, Cittowet, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Mali by sa pripraviť vhodné kontrolné roztoky, t. j. roztoky, v ktorých rozpúšťadlo alebo disperzné činidlo rozpustí testovanú látku. Použijú sa dve oddelené kontrolné skupiny: jedna s použitím vody a jedna s použitím rozpúšťadla alebo disperzanta.

1.6. POSTUP

1.6.1. **Test a kontrolné skupiny**

Počet dávok a ich opakovaní by mal spĺňať štatistické požiadavky na stanovenie LD_{50} s 95 % pravdepodobnosťou. Bežne sa na tento test požaduje päť dávok v geometrickom rade s faktorom nepresahujúcim 2,2 na daný rozsah LD_{50}. Počet dávok sa musí stanoviť vo vzťahu ku strmosti krivky toxicity (dávka versus úmrtnosť). Je potrebné vziať do úvahy štatistickú metódu, ktorá bola zvolená na analýzu výsledkov. Výber rozsahu pre test umožní vybrať vhodné koncentrácie dávkovanej látky.

Každá testovaná koncentrácia sa podá minimálne trom skupinám, každá po desiatich včelách.

Súčasne by sa mali vykonať testovacie série na aspoň troch kontrolných skupinách, každá po desiatich včelách. V prípade použitia organického rozpúšťadla alebo zvlhčovacieho činidla sa použijú tri dodatočné kontrolné skupiny po desiatich včelách.

1.6.2. **Toxický štandard**

Do testovacích sérií je potrebné zahrnúť toxický štandard. Následne sa vyselektujú aspoň tri dávky, aby sa dosiahla očakávaná hodnota LD_{50}. Pri každej testovanej dávke by sa mali použiť minimálne tri úle, každý po desiatich včelách. Preferovaný štandard toxicity je dimetoát, pre ktorý je zaznamenaná hodnota LD_{50} za 24 hodín v rozmedzí 0,10 – 0,30 μg a. s. /včelu (2). Aj iné štandardy toxicity budú akceptovateľné tam, kde sa dá získať dostatočné množstvo údajov na overenie očakávanej odozvy dávky (napr. parathion).

1.6.3. **Expozícia**

1.6.3.1. *Podávanie dávok*

Je potrebné individuálne zaobchádzať s anestezovanými včelami pri lokálnej aplikácií. Včelám sa náhodne prideľujú testovacie látky a náhodným výberom sa podrobia kontrole. Objem 1 μl roztoku obsahujúceho testovanú látku vo vhodnej koncentrácií sa bude aplikovať mikroaplikátorom na dorzálnu stranu thoraxu každej včely. V prípade opodstatnenosti je možné použiť aj iné objemy roztoku. Po aplikácií testovanej látky sa včely umiestnia do testovacích úľov a vyživujú sa roztokom sacharózy.

1.6.3.2. *Trvanie testu*

Na trvanie testu sa uprednostňuje doba 48 hodín. Ak úmrtnosť včiel prekročí hodnotu 10 % počas prvých 24 hodín až 48 hodín, trvanie testu by malo byť predĺžené na maximálne 96 hodín za predpokladu, že kontrola úmrtnosti neprekročí 10 %.

▼B

1.6.4. **Pozorovania**

Úmrtnosť sa zaznamenáva po 4 hodinách od začiatku testu a potom po 24 hodinách a po 48 hodinách. Ak je potrebný predĺžený čas pozorovania, ďalšie hodnotenie by malo prebehnúť v 24 hodinových intervaloch, avšak maximálne do celkových 96 hodín na dôkaz toho, že úmrtnosť včiel neprekročí stanovených 10 %.

Všetky abnormálne prejavy správania sa včiel počas testovaného obdobia by mali byť zaznamenané.

1.6.5. **Limitný test**

V niektorých prípadoch (napr. za predpokladu, že testovaná látka má nízku toxicitu) je možné vykonať limitný test 100 µg a. s. /včelu s cieľom dokázať, že hodnota LD_{50} je väčšia ako uvedená hodnota. Rovnaký postup by sa mal použiť vrátane troch opakovaní testu na danú testovanú látku aj na relevantnú kontrolu a použitie toxického štandardu. V prípade mortality sa celá štúdia prepracuje. Ak sa spozorujú subletálne účinky (pozri časť 1.6.4.), aj tieto je potrebné zaznamenať.

2. **ÚDAJE A SPRÁVA**

2.1. ÚDAJE

Údaje sa zosumarizujú do tabuľkovej formy, na každú pokusnú skupinu zvlášť, tak isto aj na kontrolnú skupinu včiel a skupinu použitú na zistenie toxického štandardu, na počet použitých včiel, úmrtnosť v každom období pozorovania a na počet včiel so zmeneným správaním. Údaje mortality je potrebné analyzovať vhodnými štatistickými metódami (napr. probitová analýza, pohyblivý priemer, binominálna pravdepodobnosť) (3), (4). Grafické záznamy dávok a ich odoziev by mali byť zaznamenané formou kriviek, a to v každý odporúčaný čas pozorovania (napr. 24 h, 48 h, a ak je to potrebné 72 h, 96 h) na výpočet sklonu – strmosti kriviek a stredných smrteľných dávok (LD_{50}) s 95 % pravdepodobnostnými limitami. Opravy týkajúce sa kontroly úmrtnosti sa vykonajú za pomoci Abbottových korekcií (4), (5). Tam, kde nebola úplne skonzumovaná použitá potrava, zaznamenajú sa skonzumované testovacie dávky na skupinu včiel. Hodnota LD_{50} by mala byť vyjadrená v µg testovanej látky na včelu.

2.2. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať nasledujúce informácie:

2.2.1. **Testované látky:**

— fyzikálna podstata a relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti (ako napr.: stabilita – odolnosť vo vode, tlak pár),

— identifikačné chemické údaje vrátane štruktúrneho vzorca, čistota (napr. pesticídov, identita a koncentrácia účinnej látky alebo látok).

2.2.2. **Testované druhy:**

— odborný – vedecký názov, druh, približný vek (v týždňoch), metóda zberu, dátum zberu,

— informácie o kolónach použitých na zber testovaných včiel vrátane zdravotného stavu, všetkých chorôb týkajúcich sa dospelého včelstva, všetky preliečenia atď.

▼B

2.2.3. **Podmienky testu**

— teplota a relatívna vlhkosť experimentálnej miestnosti,

— podmienky chovu včiel, vrátane typu, veľkosti a materiálu testovacích úľov,

— metódy podávania testovanej látky, napr. použité rozpúšťadlo – nosič, objem testovaného roztoku, použitý roztok anestetika,

— koncepcia testu, napr.: použitý počet a testovacie koncentrácie, počet kontrol na každú testovanú koncentráciu a kontrolu, počet kópií testovacích úľov a počet včiel na testovaný úľ,

— dátum testu.

2.2.4. **Výsledky:**

— výsledky predbežného výberu rozsahu štúdie, ak bol výber uskutočnený,

— nespracované údaje: úmrtnosť pri každej testovanej dávke pri každom pozorovanom čase,

— graf udávajúci závislosť dávky – odozvy na konci každého testu,

— hodnoty LD_{50} s 95 % pravdepodobnosťou limitu na každý odporúčaný čas pozorovania, na testovanú látku a toxický štandard,

— štatistické postupy použité na určenie LD_{50},

— úmrtnosť pri kontrolách,

— iné biologické dopady pozorované alebo merané, ako napr.: abnormálne správanie sa včiel (vrátane odmietnutia testovacej dávky potravy), pomer skonzumovanej potravy v skupinách včiel testovaných a netestovaných,

— akékoľvek odchýlky od testovacích postupov tu uvedených a všetky dostupné, relevantné informácie.

3. **POUŽITÁ LITERATÚRA**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision – Making Scheme for the Enviromental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO Bulletin, Vol.23, N.1, s. 151 – 165. March 1993.

(2) Gough, H.J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B.(1994). The use of dimethoat as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981 – 1992. Journal of Apicultural Research, 22, s. 119 – 125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method ef evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol, and Exper. Ther., s. 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, s. 265 – 267.

▼B

C.18. ADSORPCIA ALEBO DESORPCIA S POUŽITÍM ROVNOVÁŽNEJ METÓDY DÁVKOVANIA

1. METÓDA

Táto metóda je totožná s metódou OECD TG 106, na stanovenie adsorbcie alebo desorbcie v zemine, použitím dávkovacej rovnovážnej metódy (2000).

1.1. ÚVOD

Metóda sa zaoberá kruhovým testom a praktickým postupom určeným na selekciu pôdy na vývoj adsorbčného testu (1), (2), (3), (4) a tiež jeho zavedením na vnútroštátnej úrovni (5), (6) (7), (8), (9), (10), (11).

Adsorbčné alebo desorbčné štúdie sú užitočné na získavanie základných informácií o pohybe chemikálií a ich distribúcii v pôde, vode a v plynnom stave biosféry (12), (13), (14), (15), (16), (17), (18), (19), (20), (21). Tieto informácie môžu byť použité pri predvídaní alebo odhade, napríklad možnej dosažiteľnej miery degradácie chemikálie (22), (23), transformácii a po príjme organizmom (24), lúhovaním cez pôdny profil (16), (18), (19), (21), (25), (26), (27), (28), prchavosťou pôdy (21), (29), (30), prenosom z povrchu terénu do prírodných vodných zdrojov (18) (31), (32). Údaje o adsorbcii môžu byť použité na porovnávacie a modelové účely (19), (33), (34), (35).

Distribúcia chemikálii medzi pôdou a vodnými fázami je komplexný proces, ktorý závisí od počtu rozdielnych faktorov: chemickej povahy látky (12), (36), (37), (38), (39), (40), charakteristík pôdy (4), (12), (13), (14), (41), (42), (43), (44), (45), (46), (47), (48), (49) a klimatických faktorov ako sú napríklad zrážky, teplota, slnečný svit a vietor. Preto predkladaným zjednodušeným laboratórnym modelom ako je táto metóda, nemôžu byť kompletne postihnuté všetky rôznorodé fenomény a mechanizmy zahrnuté v procese adsorbcie chemikálie pôdou. Akokoľvek, aj keď sa týmto modelom nedajú pokryť všetky enviromentálne možné prípady, môže poskytnúť hodnotné informácie o význame adsorbcie chemikálií na životné prostredie.

Pozri Všeobecný úvod.

1.2. ÚČEL

Cieľom tejto metódy je stanovenie adsorbčného alebo desorbčného správania sa látok v pôde. Cieľom je získať údaje o sorpčných hodnotách, ktoré môžu byť použité na predpoklad segmentácie spomedzi množstva enviromentálnych podmienok: rovnovážnych adsorbčných koeficientov pre chemikálie na rôznych pôdach, ktoré sú vymedzené funkciou pôdnych charakteristík (ako napr.: obsah organického uhlíka, obsah ílov, pôdnou štruktúrou a pH). Použijú sa rôzne pôdne typy, aby sa čo najširšie pokryl rozsah interakcií danej látky s prírodnými typmi pôd.

V tejto metóde adsorbcia reprezentuje proces väzby chemikálie na pôdny povrch: nerozlišuje medzi rozdielnymi adsorbčnými procesmi (fyzikálnou alebo chemickou adsorbciou) a procesmi ako povrchovo katalyzovaná degradácia, rozsahom adsorbcie alebo chemickou reakciou. Adsorbcia, ktorá bude prebiehať na koloidných časticiach (o priemere 0,2 um) vytvorených pôdou, nie je bratá do úvahy.

▼B

Pôdne parametre, ktoré sú braté do úvahy z pohľadu adsorpcie a najväčšej miery dôležitosti, sú: obsah organického uhlíka (3), (4), (12), (13), (14), (41), (43), (44), (45), (46), (47), (48); obsah ílu a pôdna štruktúra (3), (4), (41), (42), (43), (44), (45), (46), (47), (48) a pH pre ionizovateľné zlúčeniny (3), (4), (42). Ďalšie pôdne parametre, ktoré môžu mať dopad na adsorpciu alebo desorpciu danej látky, sú efektívne katióny s výmennou kapacitou (ECEC), obsah amorfného železa a oxidov hliníka, hlavne na vulkanické a tropické pôdy (4), tak ako aj na špecifický povrch (49).

Test je navrhnutý na vyhodnocovanie adsorpcie chemikálií na rozdielnych pôdnych typoch s rôznymi rozsahmi obsahu organického uhlíka, obsahu ílu, pôdnej matrice a hodnoty pH pôdy. Tento test zahrňuje tri rady:

Rad 1:
— pomer pôda/roztok,

— čas potrebný na dosiahnutie adsorpčnej rovnováhy a množstvo testovanej látky adsorbovanej v rovnovážnom stave,

— adsorpcia testovanej látky na povrchoch testovaných nádob a stabilita testovanej látky počas trvania testu.

Rad 2: Skríningový test: Adsorpcia je študovaná na piatich rozdielnych pôdnych typoch v zmysle adsopčnej kinetiky pri jednotnej koncentrácii a stanovenie distribučných koeficientov K_d a K_{oc}.

Rad 3: Stanovenie Freundlichových adsorpčnych izoterm na vymedzenie vplyvu koncentrácie na rozšírenie pôdnej adsorpcie.

Štúdia desorpcie vo význame desorpčnej kinetiky/Freundlichových desorpčných izoterm (dodatok 1).

1.3. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Symbol	Definície	Jednotky
A_{t_i}	adsorpčné percento v čase t_i	%
A_{eq}	adsorpčné percento v adsorpčnej rovnováhe	%
$m_s^{ads}(t_i)$	hmotnosť testovanej latky adsorbovanej na pôdu v čase t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	hmotnosť testovanej látky adsorbovanej na pôdu počas časového intervalu Δt_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	hmotnosť testovanej látky adsorbovanej na pôdu v adsorpčnej rovnováhe	µg
m_0	hmotnosť testovanej látky v testovacej trubici na začiatku adsorpčného testu	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	hmotnosť podielu testovanej látky meranej pomere (v_a^A) v časovom bode t_i	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	hmotnosť látky v roztoku v adsorbčnej rovnováhe	µg
$m_{pôda}$	množstvo pôdnej fázy vyjadrenej ako vysušená hmota pôdy	g

▼B

Symbol	Definície	Jednotky
C_{st}	hmotnostná koncentrácia zásobného roztoku látky	ug cm^{-3}
C_0	počiatočná hmotnostná koncentrácia testovaného roztoku v kontakte s pôdou	µg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	hmotnostná koncentrácia látky vo vodnej fáze v čase t_i, v ktorom je analýza uskutočnená	µg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	obsah adsorbovanej látky na pôde v adsorpčnej rovnováhe	µg g^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	hmotnostná koncentrácia látky vo vodnej fáze v adsorpčnej rovnováhe	µg cm^{-3}
V_0	počiatočný objem vodnej fázy v kontakte s pôdou počas adsorpčného testu	cm^3
v_a^A	objem podielu, v ktorom je meraná testovaná látka	cm^3
K_d	distribučný adsorbčný koeficient	cm^3 g^{-1}
K_{oc}	organický uhlík normalizujúci adsorpčný koeficient	cm^3 g^{-1}
K_{om}	organická hmota normalizujúca distribučný koeficient	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	Freundlichov adsorpčný koeficient	$\mu g^{1-1/n}$ $(cm^3)^{1/n}$ g^{-1}
1/n	Freundlichov exponent	
D_{t_i}	desorpčné percento v časovom bode t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	desorpčné percento korešpondujúce s časovým intervalom Δt_i	%
K_{des}	aparentný desorpčný koeficient	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	Freundlichov desorpčný koeficient	$\mu g^{1-1/n}$ $(cm^3)^{1/n}$ g^{-1}
$m_{aq}^{des}(t_i)$	hmotnosť testovanej látky desorbovanej z pôdy v čase t_i	µg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	hmotnosť testovanej látky desorbovanej z pôdy počas času Δt_i	µg
$m_m^{des}(eq)$	hmotnosť látky určenej analyticky vo vodnej fáze v desorpčnej rovnováhe	µg
$m_{aq}^{des}(eq)$	celková hmotnosť testovanej látky desorbovanej v desorpčnej rovnováhe	µg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	hmotnosť zostávajúcej látky adsorbovanej na pôdu po časovom intervale Δt_i	µg
m_{aq}^A	hmotnosť látky po adsorpčnej rovnováhe pri nekompletnej objemovej zámene	µg
$C_s^{des}(eq)$	obsah zostatkovej testovanej látky adsorbovanej na pôdu v desorpčnom eguilibriu	µg g^{-1}

▼B

Symbol	Definície	Jednotky
$C_{aq}^{des}(eq)$	hmotnostná koncentrácia testovanej látky vo vodnej fáze v desorpčnej rovnováhe	µg cm^{-3}
V_T	celkový objem vodnej fázy v kontakte s pôdou počas desorpčného kinetického experimentu počas sériovej metódy	cm^3
V_R	objem supernatantu odstráneného z trubice po dosiahnutí adsorpčnej rovnováhy a nahradenej rovnakým objemom roztoku 0,01 M $CaCl_2$	cm^3
v_a^D	objem alikvotného podielu dávkovanej látky na analytické účely v čase (i), počas experimentu desorpčnej kinetiky uskutočneného sériovou metódou	cm^3
$V_{ra}{}_i^D$	objem roztoku odobratého z trubice (i) na meranie testovanej látky v experimente desorpčnej kinetiky (paralelná metóda)	cm^3
V_r^F	objem roztoku odobratého z trubice na meranie testovanej látky v desorpčnej rovnováhe	cm^3
MB	hmotnostná rovnováha	%
m_E	celkové množstvo testovanej látky extrahovanej z pôdy a stien testovacích nádob v dvoch krokoch	µg
V_{rec}	objem supernatantu získaného po adsorpčnej rovnováhe	cm^3
P_{ow}	oktanol/parciálny vodný koeficient	
pKa	disociačná konštanta	
S_w	rozpustnosť vo vode	g l^{-1}

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Známe objemy roztokov testovanej látky, neoznačenej alebo radioaktívne označenej so známymi koncentráciami v 0,01 M roztoku $CaCl_2$ sú pridané do vzoriek pôdy o známej hmotnosti v suchom stave, ktoré sú preekvilibrované s 0,01 M roztokom $CaCl_2$. Zmes sa premiešava dostatočne dlhý čas. Pôdne suspenzie sú potom oddelené odstredením a ak je potrebné filtráciou a analyzuje sa vodná fáza. Množstvo testovanej látky adsorbovanej na pôdnej vzorke je vypočítané ako rozdiel medzi množstvom testovanej látky obsiahnutej v roztoku na začiatku a zostatkového množstva látky na konci experimentu (nepriama metóda).

Variabilne je možné stanovovať množstvo adsorbovanej testovanej látky priamo analýzou pôdy (priama metóda). Tento postup, ktorý zahŕňa postupný program pôdnej extrakcie s vhodným rozpúšťadlom, sa odporúča v prípadoch, kde rozdiel koncentrácií roztoku látky nemôže byť presne určený. Príklady takýchto prípadov sú: adsorpcia testovanej látky na povrchu testovaných nádob, nestabilita testovanej látky v dobe trvania experimentu, nízka adsorpcia spôsobujúca iba malú zmenu koncentrácie v roztoku a silná adsorpcia poskytujúca nízku koncentráciu, ktorá nemôže byť presne stanovená. Ak sa používa radioaktívne označená látka, pôdna extrakcia môže byť nahradená analýzou pôdnej fázy po zhorení a tekutým scintilačným načítavaním. Nakoľko tekuté scintilačné načítavanie je nešpecifická technika, ktorá nemôže rozlišovať medzi pôvodnými a transformovanými produktmi, mala by byť použitá iba v prípade, ak je testovaná chemikália stabilná počas trvania štúdií.

▼B

1.5. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

Chemické reagenty by mali mať stupeň čistoty – analyticky čistá. Odporúča sa použitie neoznačkovaných testovacích látok so známym zložením aspoň 95 % čistoty alebo u rádiooznačených látok o známom zložení a rádio-čistoty v prípade krátkej polovičnej doby rozpadu by sa mali aplikovať korekcie na rozpad.

Pred začatím adsorpčne desorpčného testu by mali byť dostupné nasledovné informácie o testovanej látke:

a) rozpustnosť vo vode (A.6);

b) tlak pár (A.4) a/alebo Henryho konštanta;

c) abiotická degradácia: hydrolýza ako funkcia pH (C.7);

d) rozdeľovací koeficient (A.8);

e) stav biodegradability (C.4) alebo aeróbna a anaeróbna transformácia v pôde;

f) pKa ionizovateľných látok;

g) priama fotolýza vo vode (napr.: UV-Vis absorpčné spektrum vo vode, množstvo výťažku) a fotodegradácia na pôde.

1.6. APLIKOVATEĽNOSŤ TESTU

Tento test sa dá aplikovať na chemické látky, pre ktoré je možné aplikovať analytickú metódu s dostatočnou presnosťou. Dôležitým parametrom, ktorý môže ovplyvniť dôveryhodnosť výsledkov, špeciálne v prípadoch, kedy sa používa nepriama metóda, je stabilita testovanej látky v závislosti na čase počas trvania testu. T. j. predpokladá sa skontrolovať stabilitu a úvodnú štúdiu; ak sa spozoruje transformácia v závislosti na čase, odporúča sa, aby hlavná časť testu bola uskutočnená v oboch fázach, kvapalnej aj pevnej.

Pri realizovaní tohto testu sa môžu objaviť ťažkosti u testovaných látok s nízkou rozpustnosťou vo vode ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}), ako aj u veľmi nabitých látok, vzhľadom na skutočnosť, že koncentrácia v kvapalnej fáze sa nemôže merať analyticky s dostatočnou presnosťou. V takýchto prípadoch musia byť urobené dodatočné opatrenia. Návod, ako postupovať v týchto prípadoch (ako zvládnuť tieto problémy), je uvedený v zodpovedajúcej časti tejto analytickej metódy.

Pri použití prchavých látok by sa malo vyvarovať stratám počas štúdie.

1.7. OPIS METÓDY

1.7.1. **Prístroje a chemikálie**

Štandardné laboratórne vybavenie:

a) Trubice a nádobky na vykonanie experimentu. Je dôležité, aby tieto trubice a nádobky:

— zapadali do aparatúry odstredivky, aby minimalizovali manipuláciu a prenos chýb,

— boli vyrobené z nerezového materiálu, ktorý minimalizuje adsorpciu testovanej látky na ich povrchu

▼B

b) Miešacie zariadenie: trepačka alebo ekvivalentné zariadenie na trepanie, ktoré je schopné zachovať pôdu počas doby pretrepávania v stave suspenzie.

c) Odstredivka: uprednostňuje sa vysokorýchlostná, napr.: so silou odstredenia väčšou ako 3 000 g, tepelne regulovateľnou, so schopnosťou odstrániť častice s priemerom väčším ako 0,2 μm z vodného roztoku. Kontajnery by mali byť počas pretrepávania a odstreďovania uzavreté kvôli strate vody a prchavosti látok, kvôli minimalizácii adsorpcií na látky by sa mali používať deaktivované uzávery ako napr. teflónom pokryté skrutkové vrchnáčiky.

d) Voliteľné: je možné použiť aj filtračné zariadenie, filtre s porozitou 0,2 μm, sterilné, na jednorázové použitie. Špeciálna starostlivosť sa musí venovať výberu materiálu filtra kvôli zamedzeniu strát testovanej látky na jeho povrchu; pri málo rozpustných testovaných látok sa neodporúča filter z organického materiálu.

e) Analytické prístroje, vhodné na meranie koncentrácie testovaných chemikálií.

f) Laboratórna pec, schopná udržať teplotu v rozsahu 103 °C až 110 °C.

1.7.2. **Charakteristika a výber pôdy**

Pôda by mala byť charakterizovaná tromi parametrami, ktoré sú zodpovedné za ich adsorpčnú kapacitu: organický uhlík, obsah hliny a štruktúra pôdy a pH. Ako už bolo spomenuté (pozri Prehľad), ostatné fyzikálno-chemické vlastnosti pôdy môžu ovplyvňovať adsorpciu alebo desorpciu špeciálnych látok a mohli by zavážiť v takýchto prípadoch.

Metódy, ktoré charakterizujú pôdu, sú veľmi dôležité a môžu mať signifikantný vplyv na výsledky. Preto sa odporúča, aby pH pôdy bolo merané v roztoku 0,01 M $CaCL_2$ (to je roztok, ktorý sa používa pri testoch (desorpcia alebo adsorpcia) podľa odpovedajúcej ISO-10390-1. Tiež sa odporúča, aby sa ostatné relevantné vlastnosti pôdy stanovovali v súlade so štandardným postupom (napr. ISO „Príručka pre analýzu pôdy“). Toto zabezpečí analýzy sorpčných údajov na báze všeobecne štandardizovaných parametrov na pôdu. Niektoré návody, opisy existujúcich štandardných metód na analýzu a charakterizáciu pôdy je možné získať v odkazoch (50 – 52). Na kalibráciu testovacích metód na pôdu sa odporúča použiť referenčné pôdy.

Návod (sprievodca) na výber pôd na adsorpčno alebo desorpčné experimenty je uvedený v tabuľke 1. Sedem vybratých typov pôd nachádzajúcich sa v miernom geografickom pásme. Pre ionizujúce sa testovacie látky by vybraté pôdy mohli zahŕňať široké rozpätie pH, v prípade, že by mohli zhodnotiť adsorpciu látky v jej ionizujúcej a neionizujúcej forme. Návod, prehľad, na koľkých mnohých rozdielnych typoch pôd sa používa v rozličných stupňoch testuje uvedený v odseku 1.9. – Vykonanie testu.

Ak sa uprednostňujú iné typy pôdy, tieto môžu byť charakterizované tými istými parametrami a môžu mať podobné odchýlky alebo variácie vo vlastnostiach tak, ako je to uvedené v tabuľke 1, hoci nedosahujú presne uvedené kritériá.

▼B

Tabuľka 1

Návod na výber vzoriek pôdy pre adsorpciu/desorpciu

Druh pôdy	Rozsah pH (v 0,01 M $CaCl_2$)	Obsah organického uhlíka (%)	Obsah ílu (%)	Matrica pôdy (1)
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65 – 80	íl
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20 – 40	ílovitá hlina
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15 – 25	prachovitá hlina
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15 – 30	hlina
5	< 4,0 - 6,0 (2)	<0,5 - 1,5 (2) (3)	< 10 – 15 (2)	hlinitý piesok
6	> 7,0	<0,5 - 1,0 (2) (3)	40 – 65	ílovitá hlina/íl
7	< 4,5	> 10	< 10	piesok/hlinitý piesok

(1) Podľa FAO a US systému (85).
(2) Príslušné premenné by mali mať hodnoty v uvedenom rozsahu. Ak sa pri hľadaní vhodnej matrice pôdy vyskytnú ťažkosti, v takomto prípade sa môžu akceptovať aj hodnoty nižšie ako uvedené minimum.
(3) Pôdy s obsahom organického uhlíka nižším ako 0,3 % môžu pôsobiť rušivo na korelačný vzťah medzi obsahom organického uhlíka a adsorpciou. Takže sa odporúča používať pôdy s minimálnym obsahom organického uhlíka 0,3 %.

1.7.3. **Výber a skladovanie pôdnych vzoriek**

1.7.3.1 *Výber*

Neodporúčajú sa žiadne špecifické vzorkovacie techniky: vzorkovacie techniky závisia od účelu štúdie (53), (54), (55), (56), (57), (58).

Je možné uvažovať o nasledujúcich možnostiach:

a) podrobné informácie o histórii miesta poľa sú nevyhnutné; táto zahrňuje umiestnenie, vegetačný povrch, aplikáciu prípravkov na ochranu rastlín, priemyselných hnojív, biologických prípravkov alebo náhodnú kontamináciu. Odporúčania štandardu ISO o vzorkovaní pôd (ISO 10381-6) by sa mali dodržiavať s ohľadom na opis vzorkovacieho miesta.

b) vzorkovacie miesto musí byť definované podľa UTM (Universal Transversal Mercator – Projection/European Horizontal Datum) alebo geografickými súradnicami, čo môže povoliť v budúcnosti opätovné zhromažďovanie špeciálnych pôd alebo by mohlo pomôcť definovať pôdu z rôzne/rozdielne klasifikovaných systémov používaných v rozličných krajinách. Tiež iba A horizont by mohol byť zhromaždený do hĺbky 20 cm. Špeciálne pre druh pôdy č. 7, ak je prítomný O_h horizont ako časť pôdy, môže byť zaradený do vzorkovania.

Vzorky pôdy by mohli byť transportované pri použití kontajnerov za teplotných podmienok, ktoré garantujú, že počiatočné vlastnosti pôdy nie sú podstatne zmenené.

▼B

1.7.3.2. *Skladovanie*

Uprednostňuje sa používať čerstvo odobratú pôdu. Iba v prípade, keď to nie je možné, pôda sa môže uskladniť pri teplote miestnosti a mala by byť sušená na vzduchu. Nie je určený limit na uskladňovanie, ale pôda, ktorá bola uskladnená dlhšie než tri roky, by mala byť reanalyzovaná pred použitím na obsah organického uhlíka, pH a CEC.

1.7.3.3. *Manipulácia a príprava pôdnych vzoriek na test.*

Pôda sa suší vzduchom pri izbovej teplote (preferuje sa teplota medzi 20 °C – 25 °C). Desagregácia by sa mala dať vykonať s minimálnou silou tak, aby sa originálna štruktúra pôdy zmenila na najmenšiu možnú. Pôda sa preosieva na čiastočky s veľkosťou rovnou alebo menšou ako 2 mm. Mali by sa dodržiavať odporúčania štandardu ISO na vzorkovanie pôdy (ISO 10381-6) s ohľadom na sitovací proces. Odporúča sa vykonať opatrne homogenizáciu vzorky, toto prispeje k vylepšeniu reprodukovateľnosti výsledkov. Obsah vlhkosti každej pôdy sa stanoví na trikrát pri zahriatí na 105 °C až do dosiahnutia konštantnej hmotnosti (približne 12 hodín). Vo všetkých výpočtoch hmotnosť pôdy sa vzťahuje na vysušenú hmotnosť v peci, hmotnosť pôdy upravená o obsah vlhkosti.

1.7.4. **Príprava testovacej látky na aplikáciu na pôdu**

Testovaná látka sa rozpustí v roztoku 0,01 M $CaCL_2$ v destilovanej alebo deionizovanej vode; roztok $CaCL_2$ sa používa ako vodná rozpustná fáza na zlepšenie odstreďovania a minimalizácie výmeny katiónov. Koncentrácia zásobného roztoku by mala byť tri rady vyššia než detekčný limit používanej analytickej metódy. Táto prahová hodnota ochraňuje presnosť stanovenia s ohľadom na metodológiu uvedenú v tejto metóde. Naviac koncentrácia zásobného roztoku by mala byť pod rozpustnosťou testovanej látky vo vode.

Zásobný roztok by mal byť pripravený tesne pred aplikáciou na pôdne vzorky a mal by sa udržiavať v tme pri 4 °C. Čas uskladovania je závislý od stability testovanej látky a jej koncentrácie v roztoku.

Iba pre zle rozpustné látky ($S_w < 10^{-4}$ gl^{-1}), bude potrebné vhodné rozpustné činidlo, ak je ťažko rozpustná v testovanej látke. Takéto rozpúšťajúce činidlo a) by malo byť miešateľné s vodou tak ako je metanol alebo acetonitril; b) jeho koncentrácia by nemala presiahnuť 1 % z celkového objemu zásobného roztoku a mal by predstavovať menej objemu ako je v roztoku testovanej látky, ktorá prichádza do kontaktu s pôdou (pokiaľ možno menej než 0,1 %); a c) nemalo by to byť povrchovo aktívne činidlo alebo by sa nemalo podrobiť solvolytickej reakcii s testovanou chemikáliou. Použitie rozpúšťajúceho činidla sa stanoví a potvrdí výpisom údajov.

Iná alternatíva pri zle rozpustných látkach je pridať označkovanú testovanú látku do testovacieho systému. Testovacia látka je rozpustná v organických rozpúšťadlách; jej alikvotná časť sa pridá do pôdneho systému a 0,01 M $CaCl_2$ v destilovanej alebo deionizovanej vode. Obsah organického rozpúšťadla vo vodnej fáze by sa mal udržiavať tak nízko, ako je to len možné, normálne by nemal presiahnuť 0,1 %. Značkovanie organickým roztokom môže predchádzať nereprodukovateľnosti objemu. Takto môžeme zaviesť ďalšiu následnú chybu v prípade, ak koncentrácie testovanej látky ako rozpúšťadla by neboli rovnaké počas trvania celého testu.

▼B

1.8. ZÁKLADNÉ POŽIADAVKY NA VYKONANIE ADSORPCNEHO ALEBO DESORPČNÉHO TESTU

1.8.1. **Analytická metóda**

Kľúčové parametre, ktoré môžu ovplyvniť presnosť sorbčných meraní, zahŕňajú presnosť analytickej metódy použitej pri rozbore roztoku a adsorbovanej fázy, stabilitu a čistotu testovanej látky, dosiahnutie sorbčnej rovnováhy, veľkosť koncentračnej zmeny roztoku, pomer pôda a roztok a zmeny v pôdnej štruktúre počas ekvilibračného procesu (35), (59 – 62). Niektoré spôsoby chovania sa pri presných východoch sú uvedené v dodatku 2.

Spoľahlivosť použitých analytických metód sa musí skontrolovať v koncentračnom rozsahu, ktorý sa môže vyskytnúť počas testu. Experimentátor by mal mať voľnú ruku pri vyvíjaní vhodnej metódy s náležitou presnosťou, precíznosťou, reprodukovateľnosťou, detekciou limitov a výťažnosťou. Návod, ako vykonať takýto test, je uvedený v nižšie opísanom experimente.

Pôda s vysokou adsorbilitou o hmotnosti cca 20 g s vysokým obsahom organického uhlíka a obsahom ílu sa pretrepáva vo vhodnom objeme 0,01 M $CaCl_2$, napr. 100 cm^3 počas 4 hodín. Tieto udané objemy a váhy môžu kolísať v závislosti na analytických potrebách, ale pomer pôda k roztoku 1:5 je vhodné použiť ako východiskový bod. Zmes sa odstredí a vodná fáza prefiltruje. Určitý objem testovanej látky zásobného roztoku je pridaný do novšieho na dosiahnutie nominálnej koncentrácie vrátane koncentračného rozsahu, ktoré sa môžu vyskytnúť počas testu. Tento objem by nemal prekročiť 10 % konečného objemu vodnej fázy, v záujme zmeniť charakter pred dosiahnutím rovnováhy roztoku tak málo ako sa len dá. Roztok sa následne analyzuje.

Jeden slepý pokus pozostávajúci zo systému pôda + roztok $CaCl_2$, (bez testovanej látky) musí byť zahrnutý do testu z dôvodu na odhalenie artefaktov v analytickej metóde a na efekty matrice zapríčinené pôdou.

Medzi analytické metódy, ktoré môžme použiť na sorpčné merania, patria chromatografia plyn – kvapalina (GLC), vysoko účinná kvapalinová chromaografia (HPLC), spektrometria (GC/hmotnostná spektrometria – plynová chromatografia v kombinácii s hmotnostnou spektrometriou), HPLC/hmotnostná spektrometria – kvapalinová chromatografia v kombinácii s hmotnostnou spektrometriou) a kvapalné scintilačné počítadlo (na látky označené rádioaktívnou látkou). Nezávislosť použitých analytických metód je viazaná na výťažnosť, ktorá by mala byť medzi 90 % – 110 % nominálnej hodnoty.

Charakteristiky a detekcia limitov analytickej metódy vhodnej na vykonanie adsorbčnej štúdie zohrávajú dôležitú úlohu v zadefinovaní testovacích podmienok a celého experimentálneho uskutočnenia testu. Táto metóda kopíruje všeobecnú experimentálnu cestu a poskytuje odporúčania a návod na alternatívne riešenia, kde môžu analytické metódy a laboratórne vybavenie obmedzovať vykonávanie testov.

▼B

1.8.2. **Výber optimálnych pomerov pôda k roztoku**

Selekcia vhodného pomeru pôdy k roztoku na sorpčné štúdie záleží na distribučnom koeficiente K_d a relatívnom stupni požadovanej adsorpcie. Zmena koncentrácie látky v roztoku určuje štatistická presnosť meraní založených na tvare adsorpčnej rovnice a limity analytickej metodológie, pri detekcii koncentrácie chemikálie v roztoku. Vo všeobecnosti je užitočné zadať niekoľko pevných pomerov, pre ktoré je adsorpčné percento nad 20 % a vhodnejšie je viac ako 50 % (62), počas ktorej by sa mala zameriavať pozornosť na koncentráciu testovanej látky vo vodnej fáze dostatočne vysokej na to, aby bolo možné vykonať presné meranie. Toto je obzvlášť dôležité v prípade vysokých adsorpčných percent.

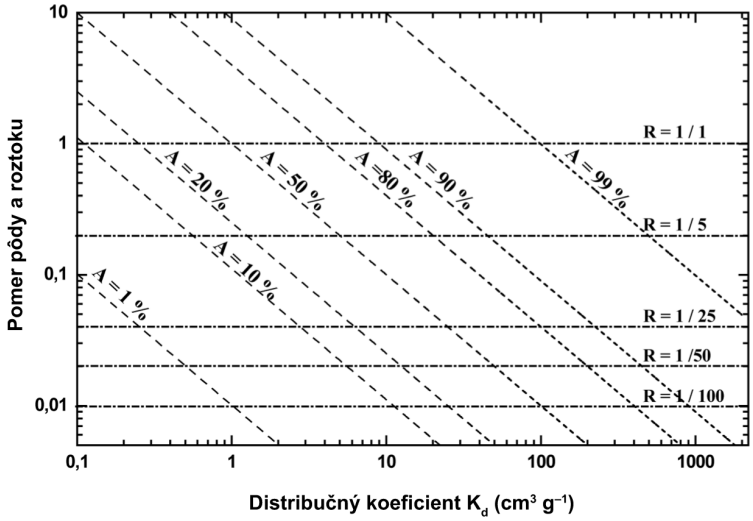
Vhodný prístup pri výbere primeraného pomeru pôda/voda je založený na odhade hodnoty K_d, buď z predbežných štúdií alebo sú stanovené bežnými technikami (dodatok 3). Výber vhodného pomeru sa uskutoční na základe záznamu vhodného pomeru pôdy a roztoku verzus hodnota K_d pre fixne stanovené adsorpčné percentá (obr. 1). V tomto zámere je predpoklad, že adsorpčná rovnováha je v lineárnom vzťahu ([1]). Aplikačný vzťah sa dosiahne zmenou usporiadania rovnice (4) pre hodnoty Kd vo forme vzťahu (1):

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1\right) K_d \qquad (1)$$

alebo v logaritmickej forme, ktorá predpokladá, že: $R = m_{pôda}/V_0$

a $A_{eq}\,\%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)}\right] \qquad (2)$$



Obr. 1. Vzťah medzi pomerom pôdy a roztoku a hodnoty K_d v rôznych adsorpčných percentách testovanej látky

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$

▼B

Obr. 1 ukazuje pomery pôdy a roztoku požadované ako funkcia K_d na rôzne hladiny adsorpcie. Napríklad v pomere pôda k roztoku v hodnote 1:5 a hodnoty K_d rovných 20, by mala nastať približne 80 % adsorpcia. Na získanie 50 % adsorpcie na tú istú hodnotu K_d musí byť použitý pomer 1:25. Tento je možné dosiahnuť vhodným pomerom pôdy a roztoku, ktorý umožňuje výskumníkovi pružnosť vo výbere experimentálnych potrieb.

Oblasti, ktoré sú problematickejšie, súvisia s tým, že niektoré chemikálie sú výrazne alebo len veľmi mierne adsorbované. Pri nízkej adsorpcii sa odporúča pomer 1:1, hoci na niektoré silne organické pôdne typy sú potrebné nižšie pomery na dosiahnutie ílovitej kaše. Dôraz sa kladie na analytickú metodológiu merania malých zmien koncentrácií roztoku, v opačnom prípade budú adsorpčné merania nepresné. Na druhej strane pri veľmi vysokých distribučných koeficientoch, K_d koeficient môže ísť až do pomeru pôdy a roztoku 1:100, kedy zanecháva signifikantné množstva chemikálie v roztoku. Pozornosť treba venovať dokonalému zmiešaniu a systému treba ponechať dostatočný čas na ekvilibráciu. V týchto extrémnych prípadoch, kde chýba primeraná analytická metodológia, je predpoklad hodnoty K_d založený na technike odhadu, napríklad na hodnotách P_{ow} (dodatok 3). Táto metóda môže byť užitočná najmä v prípadoch nízkej adsorbovateľnosti polárnych zlúčenín s hodnotou P_{ow} nižšou ako 20 a pre lipofilné – vysoko sorpčné chemikálie s hodnotou P_{ow} väčšou ako 10^4.

1.9. USKUTOČNENIE TESTU

1.9.1. Podmienky testu

Všetky experimenty sa realizujú pri izbovej teplote, ak je to možné, pri konštantnej teplote medzi 20 °C až 25 °C.

Podmienky odstreďovania musia umožňovať odstránenie čiastočiek väčších ako 0,2 μm z roztoku. Táto hodnota uvoľňuje najmenšie častice, ktoré sa považujú za pevné a je hranicou medzi pevnými a koloidnými časticami. Opis priebehu podmienok odstreďovania je uvedený v dodatku 4.

Ak odstreďovacie zariadenia nemôžu garantovať odstránenie častíc väčších ako 0,2 μm, musí sa použiť kombinácia odstredenia a filtrácie s pórovitosťou filtrov 0,2 μm. Tieto filtre by mali byť vyrobené z vhodného inertného materiálu, ktorý zabráni stratám testovanej látky na ich povrchu. V každom prípade je nutné dokázať, že počas filtrovania nedochádza k žiadnym stratám testovanej látky.

1.9.2. **Rad 1 – Úvodná štúdia**

Účel vypracovania úvodnej štúdie bol už uvedený v časti Scope (Prehľad). Návod na vymedzenie takéhoto testu je opísaný s odporučeniami na experiment, uvedenými nižšie.

1.9.2.1. *Výber optimálnych pomerov pôdy k roztoku*

Použijú sa dva pôdne typy a tri pomery pôdy k roztoku (6 experimentov). Jeden z pôdnych typov má vysoký obsah uhlíka a nízky obsah ílu, druhý má nízky obsah organického uhlíka a vysoký obsah ílu. Navrhujú sa nasledovné pomery pôdy k roztoku:

— 50 g pôdy a 50 cm^3 testovanej látky vo vodnom roztoku (pomer 1:1),

▼B

— 10 g pôdy a 50 cm^3 testovanej látky vo vodnom roztoku (pomer 1:5),

— 2 g pôdy a 50 cm^3 testovanej látky vo vodnom roztoku (pomer 1:25).

Minimálne množstvo pôdy, na ktorom sa môže uskutočniť experiment, závisí na laboratórnom vybavení a od účinnosti použitých analytických metód. Odporúča sa použiť aspoň 1 g, prípadne 2 g, ak sa chcú dosiahnuť presné výsledky testu.

Jedna kontrolná vzorka iba s testovanou látkou v roztoku 0,01 M $CaCl_2$ (bez pôdy) sa podrobí presne tomu istému postupu, aký bol použitý na test, s cieľom preskúmania stability testovanej látky v roztoku $CaCl_2$ a jej možnej adsorpcie na povrchoch testovacích nádob.

Čistá vzorka alebo slepý pokus s rovnakým množstvom pôdy o celkovom objeme 50 cm^3 0,01 M roztoku $CaCl_2$ (bez testovanej látky) sa podrobí tomu istému postupu, ako je predpísaný na test. Slúži ako spätná kontrola na pozadie počas analýzy na detekciu interferujúcich látok alebo kontaminovaných pôd.

Všetky experimenty, vrátane kontrol a slepých pokusov, by sa mali uskutočniť minimálne duplicitne. Celkový počet vzoriek, ktoré by mali byť pripravené na štúdiu, je možné vypočítať s ohľadom na metodológiu, ktorá sa bude dodržiavať.

Metódy na úvodnú štúdiu a hlavnú štúdiu sú v podstate rovnaké, výnimky sa uvádzajú iba ak je to potrebné.

Vzduchom vysušené pôdne vzorky sa ustália do rovnovážneho stavu počas noci (12 h) pred dňom experimentu, trasením, s minimálnym objemom 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$. Následne sa pridá určitý objem zásobného roztoku testovanej látky, aby sa dosiahol konečný objem 50 cm^3. Tento pridaný objem pôvodného roztoku: a) by nemal prekročiť 10 % konečného 50 cm^3 objemu vodnej fázy v snahe čo najmenej zmeniť podstatu preekvilibrovaného roztoku a b) mal by pokiaľ možno vyústiť do počiatočnej koncentrácie testovanej látky, ktorá je v kontakte s pôdou (C_o) aspoň o dva rády vyššie ako je hodnota veličiny na limit detekcie analytickej metódy; táto prahová hodnota zabezpečí schopnosť vykonať presné merania, aj keď sú hodnoty adsorpcie väčšie ako 90 % a následne stanoviť adsorpčné izotermy. Odporúča sa, ak je to možné, aby počiatočná koncentrácia látky (C_o) neprekročila polovicu limitu jej rozpustnosti.

Príklad, ako sa počíta koncentrácia zásobného roztoku (C_{st}), je uvedený v nasledujúcom texte nižšie. Predpokladaný detekčný limit je 0,01 μg cm^{-3} a 90 % adsorpcia: tak by počiatočná koncentrácia testovanej látky v pôde mala byť 1 μg cm^{-3} (dva rády hodnoty vyššia ako detekčný limit). Predpokladajme, že sa pridá maximálny odporúčaný objem zásobného roztoku, t. j. od 5 do 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ rovnovážneho roztoku (= 10 % zásobného roztoku ku 50 cm^3 celkového objemu vodnej fázy), koncentrácia zásobného roztoku by mala byť 10 μg cm^{-3}, toto sú o tri rády vyššie hodnoty ako je detekčný limit analytickej metódy.

Meranie pH vodnej fázy je potrebné vykonať pred a po kontakte s pôdou, pretože práve toto zohráva dôležitú úlohu v celom adsorpčnom procese, špeciálne na ionizovateľné látky.

▼B

Zlúčenina je až do bodu dosiahnutia adsorpčnej rovnováhy premiešavaná. Čas rovnováhy v pôdach je veľmi nestály a záleží od typu chemikálie a pôdy. Za dostatočne dlhé obdobie sa považuje 24 hodín (77). V predbežnej štúdii môžu byť vzorky zozbierané postupne počas 48 hodín miešania (napríklad pri 4, 8, 24, 48 hodinách). Aj napriek tomu by sa mal čas analýzy flexibilne zvážiť vzhľadom na pracovný program laboratória.

Sú dve možnosti, ako analyzovať testovanú látku vo vodnom roztoku: a) paralelná metóda, b) sériová metóda. Je potrebné zdôrazniť, že paralelná metóda je experimentálne viac zdĺhavá, matematické spracovanie výsledkov je jednoduchšie (dodatok 5). Výber metodológie je ponechaný na rozhodnutí experimentátora, ktorý musí zvážiť dostupné možnosti laboratórneho vybavenia a zdrojov/prostriedkov.

a) Paralelná metóda: pripravia sa vzorky s rovnakým pomerom pôdy a roztoku, v daných časových intervaloch, tak ako to požaduje štúdia adsorpčnej kinetiky. Po ukončení odstreďovania a ak je to potrebné, aj filtrácie, vodná fáza z prvej trubice sa znova čo naj dôkladnejšie použije a následne sa zmeria, napríklad po 4 hodinách, z druhej trubice po 8 hodinách a z tretej po 24 hodinách atď.

b) Sériová metóda: pripraví sa iba duplikovaná vzorka na každý pomer pôdy a roztoku. V definovaných časových intervaloch, s cieľom oddelenia fáz, je zmes odstreďovaná. Malý alikvótny podiel vodnej fázy sa ihneď analyzuje na testovanú látku, následne potom pokračuje experiment s pôvodnou látkou. Ak sa aplikuje filtrácia po odstreďovaní, laboratórium by malo mať zariadenia potrebné na zaobchádzanie s malými vodnými podielmi. Odporúča sa, aby celkový objem odobratých podielov nepresiahol 1 % celkového objemu roztoku, aby sa významne nezmenil pomer pôdy a roztoku a aby sa znížilo množstvo rozpustenej látky využiteľnej na adsorpciu počas testu.

Percentuálna adsorpcia A_{t_i} sa vypočítava v každom časovom bode (t_i) na základe nominálnej počiatočnej koncentrácie a odmeranej koncentrácie v čase dávkovania (t_i) a opravenej o hodnotu slepého pokusu. Záznamy percentuálnej adsorpcie A_{t_i} oproti času (obr. 1 dodatok 5) sú vytvorené v záujme odhadu očakávaného výsledku rovnovážneho plató ([1]). Hodnota K_d je vypočítaná v ekvilibriu. Na základe hodnoty K_d, sú vybrané vhodné pomery pôdy a roztoku z obr. 1 tak, že adsorpčné percento presiahne 20 % a prednostne viac ako 50 % (61). Všetky aplikovateľné rovnice a princípy zobrazenia sú udané v časti o Údajoch a záznamoch v dodatku 5.

1.9.2.2. *Stanovenie rovnovážneho adsorpčného času a množstva adsorbovanéj látky v stave rovnováhy*

Ako už bolo spomenuté, zobrazenia A_{t_i} alebo C_{aq}^{ads} oproti času umožňuje odhad adsorpčného ekvilibria a množstvo testovanej látky adsorbovanej v ekvilibriu. Obrázky 1 a 2 nachádzajúce sa v dodatku 5 ukazujú príklady takých záznamov. Čas rovnováhy je potrebný, aby systém dosiahol plató.

([1]) Záznamy koncentrácie testovanej látky vo vodnej fáze C_{aq}^{ads} oproti času by sa mohli takisto použiť na odhad očakávaného výsledku rovnovážneho plató (pozri obr. 2 v dodatku 5).

▼B

Ak s určitou pôdou nie je nájdené plató, ale iba stály vzostup, môže to byť spôsobené komplikujúcimi činiteľmi, ako sú biodegradácia alebo nízka difúzia. Biodegradácia sa dá zistiť opakovaným experimentom so sterilizovanou vzorkou pôdy. Ak ani v tomto prípade nie je dosiahnuté plató, experimentátor by mal hľadať iné fenomény, ktoré by mohli byť zahrnuté v jeho špecifickej štúdii; toto by sa mohlo zabezpečiť vhodnou zmenou experimentálnych podmienok (teplota, čas premiešavania, pomery pôdy a roztoku). Je na rozhodnutí výskumného pracovníka, či je vhodné pokračovať v postupe testu aj napriek možnému zlyhaniu dosiahnutia rovnováhy.

1.9.2.3. *Adsorbcia na povrchu testovacích nádobiek a stabilita testovanej látky*

Niektoré informácie, týkajúce sa adorpcie testovanej látky na povrchu testovacích nádobiek, rovnako ako aj ich stability, sa dajú odvodiť z analýzy kontrolných vzoriek. Ak sú vyčerpané všetky bežné chyby analytickej metódy, mohla by byť na príčine abiotická degradácia a/alebo adsorbcia na povrchu testovacej nádoby. Rozdiel medzi týmito dvomi faktami sa dá dosiahnuť prostredníctvom očistenia stien testovacej nádoby so známym objemom vhodného rozpúšťadla a následného vyhodnotenia roztoku použitého na vymytie nádob na obsah testovanej látky. Ak sa na povrchu testovacích látok zistí adsorpcia, rozdiel demonštruje abiotickú nestabilitu testovanej látky. Ak bola zistená takáto adsorpcia, je nevyhnutné vymeniť materiál testovacích nádob. Údaje o adsorpcii na povrchu testovacích nádob získaných z tohto pokusu nemôžu byť priamo extrapolované na pokus pôdy a roztoku.

Ďalšie údaje o stabilite testovanej látky je možné odvodiť pomocou určenia parentálnej hmotnej bilancie. To znamená, že vodná fáza, extrahovaná z pôdy a stien testovacej nádoby, sa analyzuje na obsah testovanej látky. Rozdiel medzi pridanou hmotou testovanej chemikálie a sumou hmoty testovaných chemikálii vo vodnej fáze, extraktami pôdy a stenami testovacích nádob je rovný hmote odbúranej a/alebo nestálej a/alebo neextrahovanej. V záujme uskutočnenia hmotnostnej rovnováhy, adsorpčné ekvilibrium by malo byť dosiahnuté počas obdobia trvania experimentu.

Je potrebné dosiahnuť hmotnostnú rovnováhu na obidvoch pôdach a na pomer pôdy a roztoku na každú z pôd, čím sa dosiahne zníženie presahujúce 20 % a väčšie ako 50 % ekvilibria. Akonáhle je postup na zistenie pomeru ukončený spolu s analýzou poslednej vzorky vodnej fázy po 48 hodinách, fázy sa rozdelia odstreďovaním a ak je potrebné aj filtráciou. Vodná fáza sa znovu použije v takom množstve, aké je len možné a pridá sa primeraná extrakcia rozpúšťadla (extrakčný koeficient minimálne o hodnote 95 %) do pôdy na extrakciu testovanej látky. Sú odporúčané minimálne dve postupné extrakcie. Z množstva zistenej testovanej látky v pôde a v extrakte testovacích nádob sa vypočíta hmotnostná rovnováha (rovnica 10, Údaje a záznamy). Ak je táto hodnota menšia ako 90 %, testovaná látka sa považuje za nestabilnú v časovom rozpätí testu. Aj napriek tomu je možné v štúdii pokračovať, ak sa počíta s nestabilitou testovanej látky. V prípadoch, ako bol tento, sa však odporúča analyzovať obidve fázy v hlavnej štúdii.

▼B

1.9.2.4. *Rad 2 – Adsorpčná kinetika pri jednej koncentrácii testovanej látky*

Použije sa päť pôdnych typov, vybratých z tabuľky 1. Je vhodné do týchto piatich pôdnych typov zahrnúť niektoré alebo všetky pôdne typy použité v predbežnej štúdii. V takomto prípade sa rad 2 nemusí opakovať pri pôdach, ktoré boli zahrnuté v predbežnej štúdii.

Čas rovnováhy, pomer pôdy a roztoku, váha pôdnej vzorky, objem vodnej fázy v kontakte s pôdou a koncentrácia testovanej látky v roztoku sa zvolia na základe výsledkov predbežnej štúdie. Analýza by mala byť vykonaná po 2, 4, 6, 8, (možno aj po 10) a 24 hodinách kontaktného času, čas potrebný na trepanie môže byť predĺžený maximálne na 48 hodín, a to v prípade, ak chemikália vyžaduje dlhší ekvilibračný čas, rešpektujúc tak výsledok nájdeného pomeru. Aj napriek tomu by sa mal čas určený na analýzu flexibilne zvážiť.

Každý experiment (raz pôda a raz roztok) sa realizuje aspoň dvakrát, čo umožní stanoviť odchýlky výsledkov. Do každého pokusu sa zahrnie aj jeden blank – slepý pokus. Tento pozostáva z pôdy a roztoku 0,01 M $CaCl_2$, bez testovanej látky a váhy a objemu, respektívne je identický s tými, ktoré boli použité v experimente. Na kontrolnú vzorku s obsahom iba testovanej látky v roztoku 0,01 M $CaCl_2$ (bez pôdy) sa odporúča použiť ten istý testovací postup ako poistku pred niečím neočakávaným.

Adsorpčné percento sa vypočíta v každom časovom bode A_{t_i} a/alebo časovom intervale $A_{\Delta t_i}$(podľa potreby) a je zaznamenávané oproti času. Distribučný koeficient K_d v ekvilibriu, tak ako aj organický uhlík normalizovaný adsorpčný K_{oc} (pre nepolárne organické chemikálie) sa taktiež vypočítajú.

Výsledky testu adsorbčnej kinetiky

Lineárna hodnota K_d je obyčajne vhodná na opísanie sorpčného správania v pôdach (35), (78) a reprezentuje vyjadrenie vlastnej pohyblivosti chemikálii v pôde. Napríklad vo všeobecnosti chemikálie s $K_d \leq 1\ cm^3\ g^{-1}$ sú hodnotené ako kvalitatívne mobilné. Podobne aj mobilná klasifikačná schéma založená na hodnotách K_d bola získaná MacCall *et al.* (16). Dodatočne existujúce lúhovacie klasifikačné schémy sú založené na vzťahu medzi hodnotou K_{oc} a DT-50 ([1]) (32), (79).

Podľa štúdie chybných analýz (61) sa nedajú K_d hodnoty pod 0,3 $cm^3\ g^{-1}$ správne odhadnúť z poklesu koncentrácie vo vodnej fáze, aj keď je použitý najvhodnejší pomer pôdy a roztoku (z pohľadu presnosti), t. j. 1:1. V takomto prípade sa odporúča analýza obidvoch fáz, pôdy aj roztoku.

([1]) DT-50: čas rozkladu (degradation time) 50 % testovanej látky.

▼B

S ohľadom na uvedené sa odporúča, aby sa štúdia adsorpčného správania chemikálie v pôde a jej možná pohyblivosť doplnila o presné stanovenie Freundlichovej adsorbčnej izotermy u tých systémov, u ktorých je možné presné stanovenie hodnoty K_d za použitia postupu experimentálneho protokolu popísaného v tejto metóde. Presné stanovenie je možné v prípade, ak je hodnota výsledkov získaných násobením hodnôt K_d a pomeru pôdy a roztoku väčšia ako 0,3 v prípade, ak sú merania založené na koncentračnom poklese vo vodnej fáze (nepriama metóda), alebo ak je táto hodnota väčšia ako 0,1, v prípade analýzy obidvoch fáz (priama metóda) (61).

1.9.2.5. *Rad 3 – Adsorpčné izotermy a desorpčná kinetika/desorpčné izotermy*

1.9.2.5.1. Adsorpčné izotermy

Používa sa päť testovaných koncentrácií látok, obsahujúcich dva rády veličín, pri voľbe týchto koncentrácii by sa mala vziať do úvahy rozpustnosť vo vode a výsledná koncentračná rovnováha. Je potrebné zachovať rovnaký pomer pôdy a roztoku pre danú pôdu počas celej štúdie. Adsorpčný test sa vykoná tak, ako bolo spomenuté, s jediným rozdielom, a to, že vodná fáza sa analyzuje iba raz v čase nevyhnutnom na dosiahnutie rovnováhy, ako bolo uvedené v Rade 2. Rovnovážne koncentrácie v roztoku sú určené a množstvo adsorbovanej látky sa vypočíta zo straty testovanej látky v roztoku alebo priamou metódou. Adsorbovaná hmotnosť na jednotku hmotnosti pôdy je znázornená ako funkcia rovnovážnej koncentrácie testovanej látky (pozri Údaje a správa).

Výsledky experimentu adsorpčnej izotermy

Medzi matematickými adsorbčnými modelmi doteraz navrhnutými, Freundlichova izoterma je jedna z najčastejšie používaných na opísanie adsorbčných procesov. Detailnejšie informácie na interpretáciu a dôležitosť adsorbčných modelov sú uvedené v použitej literatúre (41), (45), (80), (81), (82).

Poznámka: Je potrebné uviesť, že porovnanie hodnôt K_F (Freundlichovho adsorpčného koeficientu) pre rôzne látky je možné iba v prípade, ak sú tieto hodnoty K_F vyjadrené v rovnakých jednotkách (83).

1.9.2.5.2. Desorpčná kinetika

Účelom tohto postupu je pozorovanie, či sú chemikálie reverzibilne alebo ireverzibilne adsorbované v pôde (na pôdnych vzorkách). Táto informácia je dôležitá, keďže desorpčný proces zohráva dôležitú úlohu pri správaní sa chemikálií na pôdu v teréne. A naviac, desorpčné údaje sú užitočné vstupy do počítačových modelov na simuláciu procesu lúhovania a rozpúšťacieho procesu. Ak sa požaduje desorpčná štúdia, odporúča sa, aby bola štúdia opísaná vopred pred vykonaním testu na každý systém, na ktorý sa stanovuje presná hodnota K_d pri vykonaní testu adsorpčnej kinetiky.

Podobne pri adsorpčnej kinetickej štúdii sú dve varianty na vykonanie kinetického experimentu: a) paralelná metóda a b) sériová metóda. Výber metodológie bude ponechaný na experimentátora, ktorý posúdi možné laboratórne vybavenie a zdroje.

▼B

a) Paralelná metóda: pre každú vzorku, ktorá bola vybraná na vykonanie desorpčnej štúdie, sa pripravia vzorky s tým istým pomerom pôda a roztok, a to toľkokrát, v koľkých časových intervaloch sa požaduje študovať desorpčnú kinetiku. Preferujú sa tie isté časové intervaly, ako by boli použité pri experimente adsorpčnej kinetiky; hoci celkový čas môže byť predĺžený pri meraní v závislosti od dosiahnutia rovnováhy systému. Pri každom pokuse (jedna pôda, jeden roztok) prebehne jeden slepý pokus. Každý pokus sa skladá z pôdy a 0,01 M roztoku $CaCL_2$ bez testovanej látky, hmotnosti a objemu, respektívne je identický s experimentom. Kontrolná vzorka ako testovacia látka v 0,01 M $CaCL_2$ v roztoku (bez soli) sa podrobí tomu istému testovaciemu postupu. Všetky zmesi pôdy s roztokom sa budú vytrepávať až do dosiahnutia adsorpčnej rovnováhy (ako je to uvedené v časti rad 2). Potom sa fázy oddelia odstreďovaním a vodná fáza sa oddelí tak, ako je to najlepšie možné. Oddelený roztok sa nahradí rovnakým objemom 0,01 M $CaCL_2$ v destilovanej vode bez testovacej látky a nová zmes sa znovu vytrepe. Vodná fáza z prvej trubice sa získa tak dôkladne, ako je to možné a odmeria sa po napr. 2 hodinách, z druhej trubice po 4 hodinách a z tretej po 6 hodinách atď., až kým sa nedosiahne desorpčná rovnováha.

b) Sériová metóda: po experimente adsorpčnej kinetiky sa zmes odstredí a vodná fáza sa oddelí tak, ako je to najlepšie možné. Oddelený objem roztoku sa nahradí rovnakým objemom 0,01 M $CaCL_2$ bez testovacej látky. Nová zmes sa znovu vytrepe, až kým sa nedosiahne desorpčná rovnováha. Počas tohto časového intervalu sa bude zmes odstreďovať, aby sa oddelili fázy. Malé alikvotné množstvo sa ihneď analyzuje na testovaciu látku; potom experiment pokračuje s pôvodnou zmesou. Objem každej alikvotnej časti by mal byť menší než 1 % z celkového objemu. Také isté množstvo čerstvého roztoku 0,01 M $CaCl_2$ sa pridá do zmesi, aby sa dodržal pomer na pôdu a roztok a vytrepávanie pokračuje až do ďalšieho časového intervalu.

Percento desorpcie sa vypočíta na každý meraný čas (bodovite)D_{t_i} a/alebo aj časový interval $D_{\Delta t_i}$ (podľa potrieb štúdie) a zaznamenáva sa proti času. Rovnovážny desorpčný koeficient K_{des} sa taktiež vypočíta. Všetky aplikovateľné rovnice sú uvedené v časti „Údaje a správa“ a v dodatku 5.

Výsledky z experimentu desorpčnej kinetiky

Bežné záznamy percenta desorpcie D_{t_i} a adsorpcie A_{t_i} voči času umožňujú stanoviť reverzibilitu adsorpčného procesu. Ak desorpčná rovnováha dosiahne dvakrát čas adsorpčnej rovnováhy a celková desorpcia je väčšia než 75 % adsorbovaného množstva, adsorpcia sa považuje za reverzibilnú.

1.9.2.5.3. Desorpčná izoterma

Na pôdach, ktoré sa používajú na adsorpčno izotermický experiment, sa stanovujú Freundlichove desorpčné izotermy. Desorpčný test sa uskutoční podľa postupu uvedeného v časti „Desorpčná kinetika“ s jedným rozdielom, že vodná fáza sa analyzuje iba raz pri desorpčnej rovnováhe. Desorbované množstvo testovanej látky sa určí výpočtom. Množstvo adsorbovanej látky, ktorá sa zadrží na pôde pri desorpčnej rovnováhe, sa zaznamená ako funkcia rovnovážnej koncentrácie testovanej látky v roztoku (pozri časť „Výsledky a správa“ a v dodatku 5).

▼B

2. **ÚDAJE A SPRÁVA**

Analytické výsledky sa udávajú v tabuľkovej forme (pozri dodatok 6). Zadávajú sa jednotlivé merania a vypočítané priemery. Adsorpčné izotermy sa znázorňujú graficky. Výpočty sa robia podľa postupu, ktorý je uvedený nižšie.

Na účel tohto testu je určené, že hmotnosť 1 cm^3 vodného roztoku je 1 g. Pomer pôdy a roztoku by sa mohol vyjadriť v hmotnostných alebo objemových jednotkách s tými istými číslami.

2.1. ADSORPCIA

Adsorpcia A_{t_i} je definovaná ako percento adsorbovanej látky na pôdu, ktoré sa vzťahuje na množstvo prítomné na počiatku testu podľa podmienok testu. Ak je testovacia látka stála a neadsorbuje sa viditeľne na stenách nádoby, A_{t_i} sa vypočíta na každý časový bod t_i podľa rovnice:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (3)$$

kde:

A_{t_i} = adsorpčné percento na časový bod t_i (%);

$m_s^{ads}(t_i)$ = hmotnosť adsorbovanej testovanej látky na pôdu v čase t_i (μg);

m_o = hmotnosť testovanej látky v testovacej trubke na začiatku testu (μg).

Podrobné informácie, ako sa dá vypočítať percento adsorpcie A_{t_i} pre paralelné a sériové metódy, je uvedený v dodatku 5.

Distribučný koeficient K_d je pomer medzi obsahom látky v pôdnej fáze a hmotnostnou koncentráciou látky vo vodnom roztoku za podmienok testu v stave dosiahnutia adsorpčnej rovnováhy.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} \ (cm^3 \ g^{-1}) \qquad (4)$$

kde:

$C_s^{ads}(eq)$ = obsah látky adsorbovanej na pôde pri adsorpčnej rovnováhe (μg g^{-1});

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = hmotnostná koncentrácia látky vo vodnej fáze pri adsorpčnej rovnováhe (μg cm-^{3}). Táto koncentrácia sa stanoví pomocou hodnôt získaných zo slepého pokusu

$m_s^{ads}(eq)$ = obsah látky adsorbovanej na pôde pri adsorpčnej rovnováhe (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = obsah látky adsorbovanej v roztoku pri adsorpčnej rovnováhe (μg);

m_{soil} = množstvo pevnej fázy, vyjadrenej ako sušina (suchá pôda) (g);

V_o = počiatočný objem vodnej fázy v styku s pôdou (cm^3).

Vsťah medzi $A_{eq\ a}$ K_d je daný

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} \ (cm^3 \ g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

kde:

A_{eq} = percento adsorpcie pri adsorpčnej rovnováhe, %.

Organický uhlík normalizovaný adsorpčný koeficient K_{oc} súvisí s distribučným koeficientom K_d k obsahu organického uhlíka vo vzorke pôdy:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \ (cm^3 \ g^{-1}) \quad (6)$$

kde:

%OC = percento organického uhlíka vo vzorke pôdy (g g^{-1}).

K_{oc} koeficient predstavuje jednoduchú hodnotu, ktorá charakterizuje účasť vo väčšine nepolárnych organických zlúčenín medzi organickým uhlíkom v pôde alebo sedimentom a vodou. Adsorpcia týchto chemikálií sa koreluje na obsah organicky sorbujúcej tuhej látky (7), kde hodnoty K_{oc} závisia od špecifických charakteristík glejovitých frakcií, ktoré sa významne odlišujú v sorpčnej kapacite vzhľadom na odlišnosti v pôvode, vývoji atď.

2.1.1. **Adsorpčné izotermy**

Rovnica pre Freundlichove adsorpčné izotermy súvisí s množstvom adsorbovanej testovanej látky ku koncentrácii testovanej látky v roztoku pri rovnováhe (rovnica 8).

Výsledky sa triedia ako „adsopcia“ a na každú testovaciu trubicu, obsah adsorbovanejtestovacej látky na pôdu po adsorbčnom teste [$C_s^{ads}(eq)$, je niekde inde označená ako x/m] sa vypočíta. Predpokladá sa, že rovnováha bola dosiahnutá a $C_s^{ads}(eq)$ reprezentuje hodnotu rovnováhy:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right].V_0}{m_{soil}} \ (\mu g \ g^{-1}) \quad (7)$$

Freundlichova adsorpčná rovnica je zobrazená v (8).

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads}.C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g \ g^{-1}) \quad (8)$$

alebo v lineárnom tvare:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

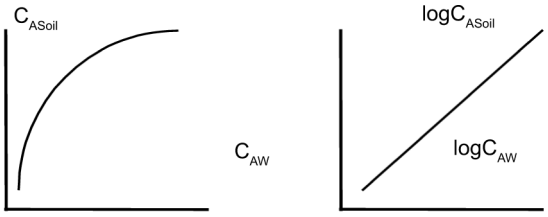
kde:

K_F^{ads} = Freundlichov adsorbčný koeficient; jeho rozmer je $cm^3 \ g^{-1}$. Len ak l/n = 1; vo všetkých ostatných prípadoch strmosť l/n je daná rozmerom K_F^{ads} $(\mu g^{1-1/n} \ (cm^3)^{1/n} \ g^{-1})$;

n = regresná konštanta; l/n bežný rozsah je v rozpätí 0,7 – 1,0, indikuje, že sorpčné údaje sú často mierne nelineárne.

Rovnice (8) a (9) sú zaznamenané a hodnoty K_F^{ads} a l/n sú vypočítané regresnou analýzou s využitím rovnice (9). Korelačný koeficient r^2 z logaritmickej rovnice je tiež vypočítaný. Príklad takéhoto zobrazenia je na obr.2.

▼B



Obr. 2. Freundlichova adsorpčná krivka normálna a linearizovaná

2.1.2. **Hmotnostná bilancia**

Hmotnostná bilancia (MB) je definovaná ako percento látky, ktorá môže byť analyticky obnovená po adsorpcii testu oproti počiatočnému množstvu látky na začiatku testu.

Spracovanie výsledkov sa bude líšiť, ak je rozpúšťadlo kompletne miešateľné s vodou. V prípade vodou miešateľného rozpúšťadla je spracovanie výsledkov opísané v časti „Opis“, môže byť aplikované na stanovenie množstva látky obnovenej po extrakcii rozpúšťadla. Ak je rozpúšťadlo menej miešateľné s vodou, stanovenie/určenie obnoveného množstva sa musí stanoviť.

Hmotnostná bilancia MB na adsorpciu sa vypočíta nasledovne: vychádza sa z toho, že údaj (m_E) korešponduje so sumou hmotností testovaných chemikálií extrahovaných z pôdy a povrchu testovaných pojív s rozpúšťadlom.

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} (\%) \quad (10)$$

kde:

MB = hmotnostná bilancia (%);

m_E = celková hmotnosť testovanej látky vyextrahovanej z pôdy a stien testovacej nádoby v dvoch krokoch (μg);

C_o = počiatočná hmotnostná koncentrácia testovaného roztoku v styku s pôdou (μg cm^{-3});

V_{rec} = objem kalu obnoveného po adsorpčnej rovnováhe (cm^{-3}).

2.2. DESORPCIA

Desorpcia (D) je definovaná ako percento testovanej látky, ktoré je desorbované, vztiahnuté ku kvantite látky, ktorá bola adsorbovaná predtým za testovacích podmienok.

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (11)$$

kde:

D_{ti} = desorpčné percento v jednotkovom bode/čase t_i (%);

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = hmotnosť testovanej látky desorbovanej z pôdy v časovom bode t_i (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = hmotnosť testovanej látky adsorbovanej do pôdy pri adsorpčnej rovnováhe (μg).

Podrobné informácie o tom, ako sa má postupovať pri výpočte percenta desorpcie D_{t_i} paralelnej a sériovej metóde, sú uvedené v dodatku 5.

Zjavný desorpčný koeficient (K_{des}) je, za podmienok testu, pomer medzi obsahom lát zadržanej v pôde a hmotnostnou koncentráciou desorbovanej látky vo vodnom roztoku dosiahnutí desorpčnej rovnováhy.

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (12)$$

kde:

K_{des} = dessorpčný koeficient ($cm^3\ g^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = celková hmotnosť testovanej látky desorbovanej z pôdy pri desorpčnej rovnováhe (μg);

V_T = celkový objem vodnej fázy v kontakte s pôdou počas desorpčných kinetických testov (cm^3).

Návod na výpočet $m_{aq}^{des}(eq)$ je uvedený v dodatku 5, v časti pod názvom „Desorpcia“.

Poznámka

Ak bol urobený adsorpčný test, ktorý sa vykonal paralelnou metódou, objem V_T v rovnici 12 by mal byť rovnaký s objemom V_o.

2.2.1. **Desorpčné izotermy**

Rovnica pre Freundlichove desorpčné izotermy udáva vzťah obsahu testovanej látky, zadržanej adsorpciou na vzorke pôdy, ku koncentrácii testovanej látky v roztoku pri adsorpčnej rovnováhe (rovnica 16).

Pre každú testovaciu trubicu sa obsah látky zadržanej adsorbciou na pôdnej vzorke pri desorpčnej rovnováhe vypočíta nasledovne:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ je definovaná ako:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A\ (\mu g) \quad (14)$$

kde:

$C_s^{des}(eq)$ = obsah testovanej látky zadržanej na pôdnej vzorke pri desorpčnej rovnováhe (μg g^{-1});

$m_m^{des}(eq)$ = hmotnosť látky stanovenej analyticky vo vodnej fáze pri desorpčnej rovnováhe (μg);

▼B

m_{aq}^{A} = hmotnosť zostatkovej testovanej látky po adsorpčnej rovnováhe ku nekompletnému náhradnému objemu (μg);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = hmotnosť látky v roztoku pri adsorpčnej rovnováhe (μg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = objem odobratého roztoku z trubice na stanovenie testovanej látky pri adsorpčnej rovnováhe (cm^3);

V_R = objem glejovitého roztoku odobratého z trubice po dosiahnutí adsorpčnej rovnováhy a nahradení toho istého objemu 0,01M roztokom $CaCl_2$ (cm^3);

Freundlichova desorpčná rovnica je v (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} \ (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

alebo v lineárnom tvare:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F{}^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}{}^{des}(eq) \quad (17)$$

kde:

K_F^{des} = Freundlichov desorpčný koeficient;

n = regresná konštanta;

$C_{aq}^{des}(eq)$ = hmotnostná koncentrácia látky vo vodnej fáze pri desorpčnej rovnováhe (μg cm^{-3}).

Rovnice 16 a 17 sa môžu znázorniť a hodnoty K_F^{des} a vypočítajú sa z regresnej analýzy použitím rovnice 17.

Poznámka

Ak Freundlichov adsorpčný alebo desorpčný exponent l/n je rovný 1, Freundlichova adsorpčná alebo desorpčná väzobná konštanta (K_F^{ads} a K_F^{des}) bude rovná adsorbčnej a desorpčnej rovnovážnej konštante (K_d a K_{des}) respektívne, a záznamy C_s a C_{aq} budú lineárne. Ak exponent nie je rovný 1, záznamy C_s a C_{aq} nebudú lineárne a adsorpčná a desorpčná konštanta sa budú meniť pozdĺž izotermy.

2.2.2. **Správa z testu**

Správa z testu má obsahovať nasledovné informácie:

— kompletnú identifikáciu použitých pôdnych vzoriek vrátane:

— geografické odkazy o mieste (zemepisná šírka, zemepisná dĺžka),

— dátum vzorkovania,

▼B

— použitý vzor (poľnohospodárska pôda, les atď.),

— hĺbka vzorkovania,

— obsah piesku (bahna alebo ílu),

— pH hodnoty (v 0,01 M $CaCl_2$),

— obsah organického uhlíka,

— obsah organickej hmoty,

— obsah dusíka,

— pomer C/N,

— kapacita výmeny katiónov (mmol/kg),

— všetky informácie súvisiace s kumuláciou, skladovaním pôdnych vzoriek,

— kde je to vhodné, všetky relevantné informácie na interpretáciu adsorpcie/desorpcie testovanej látky,

— odkazy na metódy použité pre stanovenie každého parametra,

— informácie o testovanej látke, ak je to potrebné,

— teplota pri experimente,

— podmienky na odstreďovanie,

— analytický postup použitý na analýzu testovanej látky,

— rozhodnutie o výbere rozpúšťacieho činidla na prípravu zásobného roztoku testovanej látky,

— ak je to relevantné, uviesť korelácie robené výpočtom,

— údaje v súlade s prepisom ako je to v dodatku 6 a grafické znázornenie,

— všetky informácie a pozorovania, ktoré môžu byť nápomocné pri interpretácii výsledkov testu.

3. **POUŽITÁ LITERATÚRA**

(1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02045, Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18 – 20 January 1995 (June 1995).

(5) US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

(6) US Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.

(7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

(8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

(9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

(11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

(12) Calvet R., (1989), „Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils“, in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

(13) Calvet R., (1980), „Adsorption-Desorption Phenomena“ in Interactions between herbicides and the soil. (R. J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83 – 122.

(14) Hasset J. J., and Banwart W.L., (1989), „The sorption of nonpolar organics by soils and sediments“ in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp. 31 – 44.

(15) Van Genuchten M. Th., Davidson J. M., and Wierenga P. J., (1974), „An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media“. Soil Sci. Soc. Am. Proc, Vol. 38(1), pp. 29 – 35.

(16) McCall P. J., Laskowski D. A., Swann R. L., and Dishburger H. J., (1981), „Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis“, in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

(17) Lambert S. M., Porter P. E., and Schieferrstein R. H., (1965), „Movement and sorption of chemicals applied to the soil“. Weeds, 13, pp. 185 – 190.

(18) Rhodes R. C, Belasco I. J., and Pease H. L., (1970) „Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils“. J.Agric.Food Chem., 18, pp. 524 – 528.

(19) Russell M. H., (1995), „Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil“ in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T. R. Roberts and P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

(20) Esser H. O., Hemingway R. J., Klein W., Sharp D. B., Vonk J. W. and Holland P. T., (1988), „Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides“, IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, pp. 901 – 932.

▼B

(21) Guth J. A., Burkhard N., and D. O. Eberle, (1976), „Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils“. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp. 137 – 157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C. G. L., and Osgerby J. M., (1967), „Persistence of herbicides in soil“. J. Sci. Fd Agric, 18, pp. 269 – 273.

(23) Burkhard N., and Guth J. A., (1981), „Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-l,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption“. Pestic. Sci. 12, pp. 45 – 52.

(24) Guth J. A., Gerber H. R., and Schlaepfer T., (1977), „Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides“. Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, pp. 961 – 971.

(25) Osgerby J. M., (1973), „Process affecting herbicide action in soil“. Pestic. Sci., 4, pp. 247 – 258.

(26) Guth J. A., (1972), „Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Bôden“. Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, pp. 143 – 154.

(27) Hamaker J. W., (1975), „The interpretation of soil leaching experiments“, in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135 – 172, Plenum Press, NY.

(27) Helling C. S., (1971), „Pesticide mobility in soils“. Soil Sci. Soc. Amer. Proc, 35, pp. 732 – 210.

(29) Hamaker J. W., (1972), „Diffusion and volatilization“ in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds), Vol. I, pp. 49 – 143.

(30) Burkhard N. and Guth J. A., (1981), „Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system“. Pestic. Sci. 12, pp. 37 – 44.

(31) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses“, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297 – 325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D. I., (1989), „Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide teachability“. J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), pp. 339 – 357.

(33) Leistra M., and Dekkers W. A., (1976). „Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils“. J. of Soil Sci., 28, pp. 340 – 350.

(34) Bromilov R. H., and Leistra M., (1980), „Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils“. Pest. Sci., 11, pp. 389 – 395.

(35) Green R. E., and Karickoff S. W., (1990), „Sorption estimates for modeling“, in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80 – 101,

(36) Lambert S. M., (1967), „Functional relationship between sorption in soil and chemical structure“. J. Agri. Food Chem., 15, pp. 572 – 576.

▼B

(37) Hance R. J., (1969), „An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils“. J. Agri. Food Chem., 17, pp. 667 – 668.

(38) Briggs G. G. (1969), „Molecular structure of herbicides and their sorption by soils“. Nature, 223, 1288.

(39) Briggs G. G. (1981). „Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor“. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050 – 1059.

(40) Sabljic A., (1984), „Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology“. J. Agric. Food Chem., 32, pp. 243 – 246.

(41) Bailey G. W., and White J. L., (1970), „Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil“. Residue Rev., 32, pp. 29 – 92.

(42) Bailey G. W., J. L. White and Y. Rothberg., (1968), „Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate“. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32: pp. 222 – 234.

(43) Karickhoff S. W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils“. Chemosphere 10, pp. 833 – 846.

(44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), „Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners“. Environ. Toxicol. Safety 21, pp. 1 – 17.

(45) Hamaker J. W., and Thompson J. M., (1972), „Adsorption in organic chemicals“ in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49 – 143.

(46) Deli J., and Warren G. F., 1971, „Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils“. Weed Sci. 19: pp. 67 – 69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J. M. and Santelmann, (1975), „Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils“. Weed Science, Vol. 23, pp. 454 – 457.

(48) Haues M. H. B., Stacey M., and Thompson J. M., (1968), „Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations“ in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H. B., and Deangelis R. J., (1980), „Methods for distributing pesticide loss in field 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 S 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 Š Sampling Š Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality Š Sampling Š Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality S Sampling S Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality Š Sampling Š Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality S Sampling S Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.3

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality Š Sampling Š Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R. E., and Yamane V. K., (1970), „Precision in pesticide adsorption measurements“. Soil Sci. Am. Proc., 34, pp. 353 – 354.

(60) Grover R., and Hance R. J. (1970), „Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine“. Soil Sci., pp. 109 – 138.

(61) Boesten, J. J. T. I, „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system“. Pest. Sci. 1990, 30, pp. 31 – 41.

(62) Boesten, J. J. T. I. „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106“. Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26 – 29. April 1994.

(63) Bastide J., Cantier J. M., et Coste C, (1980), „Comportement de substances herbicides dans le sol enfonction de leur structure chimique“. Weed Res. 21, pp. 227 – 231.

(64) Brown D. S., and Flagg E. W., (1981), „Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments“. J. Environ.Qual., 10(3), pp. 382 – 386.

(65) Chiou C. T., Porter P. E., and Schmedding D. W., (1983), „Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water“. Environ. Sci. Technol., 17(4), pp. 227 – 231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), „Sorption of organic substances by soils and sediments“. J. Environm. Sci. Health, B19 (3), pp. 297 – 312.

(67) Vowles P. D., and Mantoura R. F. C, (1987), „Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons“. Chemosphere, 16(1), pp. 109 – 116.

(68) Lyman W. J., Reehl W. F.and Rosenblatt D. H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E. E., and Goring, C. A. I. (1980). „Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota“ in Aquatic Toxicology (eds J.G Eaton, et al.), pp. 78 – 115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

(70) Chiou C. T., Peters L. J., and Freed V. H., (1979), „A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds“. Science, Vol. 206, pp. 831 – 832.3

(71) Hassett J. J., Banwart W. I., Wood S. G, and Means J. C, (1981), „Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption“. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, pp. 38 – 42.

(72) Karickhoff S. W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils“. Chemosphere, Vol. 10(8), pp. 833 – 846.

(73) Moreale A., van Bladel R., (1981), „Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité-reactivité“. Revue de l'Agric., 34 (4), pp. 319 – 322.

(74) M., Kôrdel W. (1996), „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil“. Chemosphere, 32(12), pp. 2493 – 2504.

(75) Kôrdel W., Kotthoff G, Muller M. (1995), „HPLC Š screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil S results of a ring test“. Chemosphere 30 (7), pp. 1373 – 1384.

(76) Kôrdel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), „HPLC Š screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil S comparison of different stationary phases“. Chemosphere 27 (12), str. 2341 – 2352.

(77) Hance, R. J., (1967), „The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides“. Weed Research, Vol. 7, str. 29 – 36.

(78) Koskinen W. C, and Harper S. S., (1990), „The retention processes: mechanisms“ in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F., and Enfield C. G (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses“, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297 – 325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C. H., (1970), „Interpretation and use of sorption isotherms“ in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, str. 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, str. 3973 – 93.

(82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J. C, (1980), „Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques generales de l'adsorption“. Ann. Agron. 31: str 239 – 251.

(83) Bedbur E., (1996), „Anomalies in the Freundlich equation“, Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13 – 15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

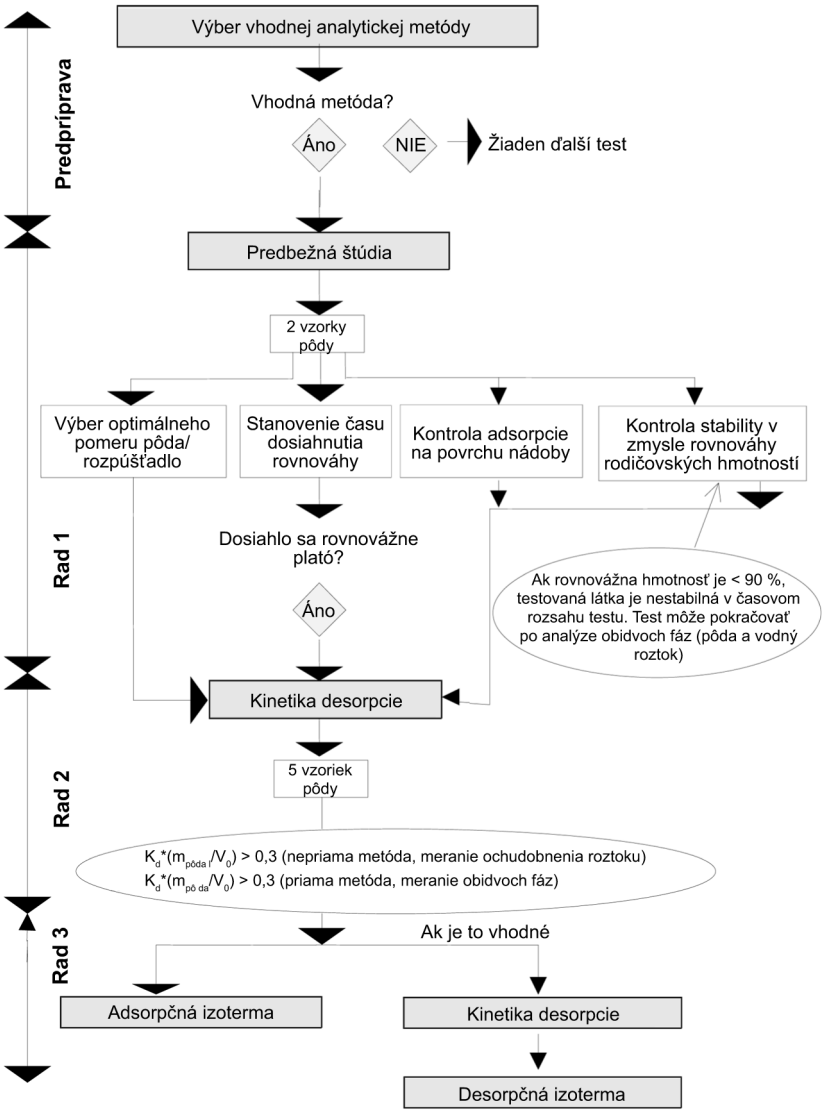
(84) Guth, J. A., (1985), „Adsorption/desorption“, in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1 – 3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼B

DODATOK 1

Schéma testu



▼B

DODATOK 2

VPLYV PRESNOSTI ANALYTICKEJ METÓDY A KONCENTRAČNÝCH ZMIEN NA PRESNOSŤ VÝSLEDKOV ADSORPCIE

Z nasledujúcej tabuľky (8.4) vyplýva, že rozdiel medzi počiatočnou hmotnosťou (m_0 = 110 µg) a rovnovážnou hmotnosťou ($m_{aq}^{ads}(eq)$= 100 µg) testovanej látky v roztoku je veľmi malý, 5 % odchýlka pri meraní výsledkov rovnovážnej hmotnosti sa prejaví 50 % odchýlkou vo výpočte hmotnosti látky absorbovanej v pôde ($m_s^{ads}(eq)$)a 52,4 % vo výpočte K_d.

Množstvo pôdy $m_{pôda}$ = 10 g

Objem roztoku 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 alebo C_0=1,100 µg/cm^3	**PRE A = 9 %**							
	100	1,000	skutočná hodnota	10	1,00	skutočná hodnota	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 alebo C_0=1,100µg/cm^3	**PRE A = 55 %**							
	50,0	0,500	skutočná hodnota	60,0	6,00	skutočná hodnota	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 alebo C_0=1,100 µg/cm^3	**PRE A = 99 %**							
	1,100	0,011	skutočná hodnota	108,9	10,89	skutočná hodnota	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 %

kde:

$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq), C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right] V_0}{m_{soil}}$. $Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}}$

$m_s^{ads}(eq)$ = hmotnosť testovanej látky v pôde v rovnovážnom stave, µg;

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = hmotnosť látky v roztoku v čase adsorpčnej rovnováhy, µg;

$C_s^{ads}(eq)$ = obsah testovanej látky v pôdnej faze v rovnovážnom stave, µg g^{-1}:

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = hmotnostná koncentrácia testovanej látky vo vodnej fáze v rovnovážnom stave, µg cm^{-3}

R = analytlická odchýlka pri stanovení $m_{aq}^{ads}(eq)$;

R‡ = vypočítaná odchýlka spôsobená analytickou chybou R.

▼B

DODATOK 3

TECHNIKA ODHADU K_d

1. Technika odhadu umožňuje predpoklad K_d na základe korelácie, napr. s hodnotami P_{ow} (12), (39), (63 – 68), s údajmi o rozpustnosti vo vode (12), (19), (21), (39), (68 – 73) alebo s údajmi o polarite získanými uplatnením HPLC na obrátených fázach (74 – 76). Ako je vidieť z tabuliek 1 a 2, hodnoty K_{oc} a K_{om} sa vypočítavajú podľa týchto rovníc a potom nepriamo, K_d podľa týchto rovníc:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \, (cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1{,}724} \cdot \frac{100}{\%oc} \, (cm^3 g^{-1})$$

2. Podstata týchto korelácií je založená na dvoch predpokladoch: (1) na organickej podstate pôdy, hlavne jej vplyvoch na adsorpciu látky a (2) na interakciách, hlavne medzi nepolárnymi látkami. Výsledkom týchto korelácií je: (1) nie sú alebo sú iba do istej miery aplikovateľné na polárne látky a (2) sú neaplikovateľné v prípadoch, kde obsah organickej látky v pôde je veľmi malý (12). Okrem toho, hoci medzi P_{ow} a adsorpciou (19) bola zistená uspokojivá súvzťažnosť, to isté sa nedá tvrdiť o vzťahu medzi rozpustnosťou vo vode a rozpätím adsorpcie (19), (21); keďže sú štúdie ohľadom tejto témy veľmi protichodné.

3. V tabuľkách 1 a 2 sú uvedené niektoré príklady korelácií medzi adsorpčným koeficientom a rozdeľovacím koeficientom pre oktanol-voda, ako aj rozpustnosť vo vode.

Tabuľka 1

Príklady korelácií medzi adsorpčným koeficientom a rozdeľovacím koeficientom pre oktanol-voda, ďalšie príklady pozri (12) (68).

Látky	Korelácie	Autori
Substituované močoviny	$\log K_{om} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Chlórované aromáty	$\log K_{oc} = - 0{,}779 + 0{,}904 \log P_{ow}$	Chiou *et al.* (1983) (65)
Rôzne prípravky na ochranu rastlín	$\log K_{om} = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{ow}$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Aromatické uhľovodíky	$\log K_{oc} = - 2{,}53 + 1{,}15 \log P_{ow}$	Vowles and Mantoura (1987) (67)

Tabuľka 2

Príklady korelácií medzi adsorpčným rozdeľovacím koeficientom a rozpustnosťou vo vode; ďalšie príklady pozri (68) (69).

Látky	Korelácie	Autori
Rôzne prípravky na ochranu rastlín	$\log K_{om} = 3{,}8 – 0{,}561 \log S_w$	Gerstl and Mingelgrin (1984)(66)
Alifatické, aromatické chlórované látky	$\log K_{om} = (4{,}040 +/– 0{,}038) – (0{,}557 +/– 0{,}012) \log S_w$	Chiou *et al.* (1979) (70)
α-naftol	$\log K_{oc} = 4{,}273 – 0{,}686 \log S_w$	Hasset *et al.* (1981) (71)
Cyklické, alifatické aromatické látky	$\log K_{oc} = - 1{,}405 – 0{,}921 \log S_w - 0{,}00953 (mp-25)$	Karickhoff(1981)(72)
Rôzne zlúčeniny	$\log K_{om} = 2{,}75 – 0{,}45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

DODATOK 4

VÝPOČTY NA DEFINOVANIE PODMIENOK ODSTREĎOVANIA

1. Čas odstreďovania je stanovený nasledujúcim vzorcom za predpokladu, že častice majú sférický tvar:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 r p^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln\left(R_b/R_t\right) \quad (1)$$

Na zjednodušenie sú všetky parametre popísané v jednotkách SI (g, cm).

Kde:

ω = rýchlosť rotácie (=2 π rpm/60), rad s^1;

rpm = počet otáčok za minútu;

η = viskozita roztoku, g s^{-1} cm^{-1};

r_p = polomer častice, cm;

ρ_s = hustota pôdy (merná hmotnosť), g cm^{-3};

ρ_{aq} = hustota roztoku (merná hmotnosť), g cm^{-3};

R_t = vzdialenosť od stredu rotora odstredivky po vrchol roztoku v odstred'ovacej skúmavke, cm;

R_b = vzdialenosť od stredu rotora odstredivky po spodok roztoku v odstred'ovacej skúmavke, cm;

$R_b - R_t$ = výška stĺpca zmesi pôdy a roztoku v odstreďovacej skúmavke, cm.

V bežnej praxi sa používa dvojnásobok vypočítaného času odstreďovania, aby sa zaistila úplná separácia.

2. Rovnica (1) sa dá ďalej zjednodušiť, ak budeme považovať dynamickú viskozitu (η) a hustotu [mernú hmotnosť] (ρ_{aq}) roztoku za rovnú dynamickej viskozite a hustote vody pri 25 °C, teda $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g.s^{-1} cm^{-1} a ρ_{aq} = 1,0 g. cm^{-3}.

Potom je čas odstreďovania daný rovnicou (2):

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 . r_p^2(\rho_s - l)} \ln \frac{Rb}{Rt} \quad (2)$$

3. Z rovnice (2) je zrejmé, že nasledujúce dva parametre sú dôležité na definovanie podmienok odstreďovania, t. j. čas t) a rýchlosť (rpm), aby sa dosiahla separácia častíc so špecifickou veľkosťou (v našom prípade priemer častíc 0,1 μm): merná hmotnosť pôdy a (2) výška stĺpca zmesi v odstreďovacej skúmavke ($R_b - R_t$), t. j. vzdialenosť, ktorú častica pôdy pokrýva od vrcholu roztoku po spodok skúmavky; je zrejmé, že pre stály obhem bude výška stĺpca v skúmavke závisieť od štvorca polomeru skúmavky.

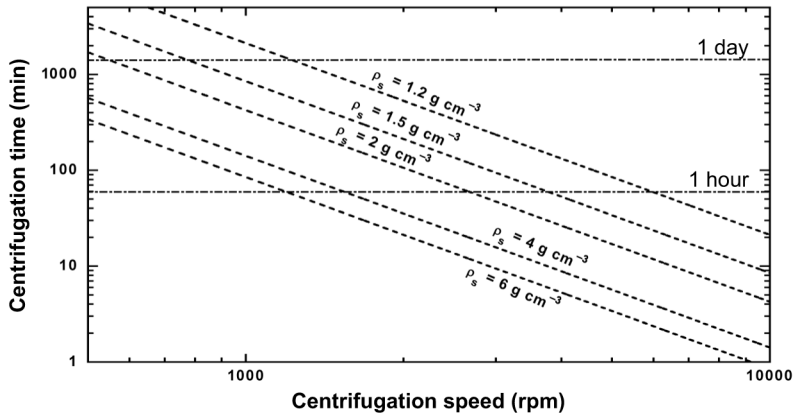
4. Obr. 1 predstavuje variácie v čase odstreďovania t) verzus rýchlosť (rpm) pri rôznych hodnotách mernej hmotnosti pôdy (p_s) (obr. la) a rôzne výšky stĺpcov zmesí v odstreďovacej skúmavke (obr. 2a). Z obr. la je vidieť, že vplyv mernej hmotnosti pôdy sa stáva očividným; napr. pri klasickom odstreďovaní pri 3000 otáčkach/min. je čas odstreďovania približne 240 min. pri mernej hmotnosti pôdy 1,2 g cm^3, zatiaľ čo pri mernej hmotnosti pôdy rovnajúcej sa 2,0 g cm^3 je to iba 50 min. Podobne (obr. lb) pri klasickom odstreďovaní pri 3000 otáčkach/min. je čas odstreďovania približne 50 min. pri výške stĺpca zmesi 10 cm a iba 7 min. pri výške stĺpca 1 cm. Je však dôležité nájsť optimálny vzťah medzi odstreďovaním, ktoré vyžaduje najmenšiu možnú výšku stĺpca a ľahkou manipuláciou pre experimentátora pri oddeľovaní fáz po odstreďovaní.

▼B

5. Okrem toho, pri definovaní experimentálnych podmienok na separáciu fáz pôdy a roztoku je dôležité vziať do úvahy možnú existenciu tretej „pseudofázy“ koloidov. Tieto častice, s veľkosťou menšou ako 0,2 μm môžu mať významný vplyv na celý mechanizmus adsorpcie látky v pôdnej suspenzii. Po ukončení odstreďovania, ako je popísané vyššie, koloidy zostávajú vo vodnej fáze a sú podrobené analýze spolu s vodnom fázou. Takto sa stratí informácia o ich vplyve.

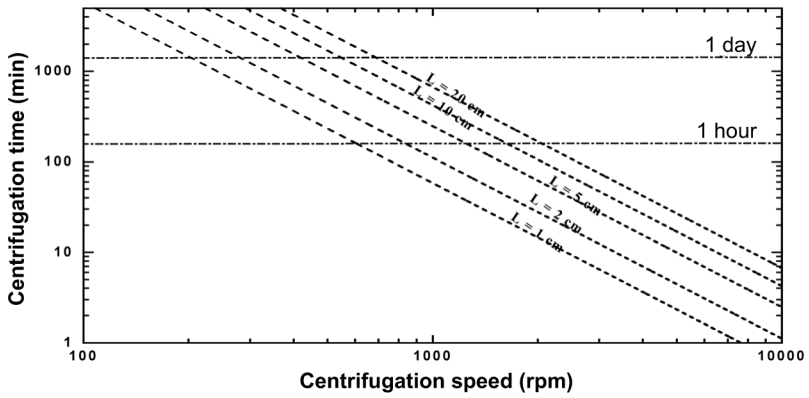
   Ak má riadiace laboratórium veľkú odstredivku alebo možnosť ultrafiltrácie, adsorpcia/desorpcia látky vo vode sa dá preskúmať do väčšej hĺbky vrátane informácií o adsorpcii látky na koloidoch. V tomto prípade sa ultraodstredivka nastaví na 60 000 otáčok/min alebo sa použije ultrafiltrácia s filtrom o porozite/veľkosť pórov/100 000 daltonov, aby sa oddelili tri fázy – pôda, koloidy, roztok. Podľa toho sa upraví aj protokol o výsledkoch testu, aby sa všetky tri fázy stali súčasťou analýzy.

Obr. 1a



Variácie času odstreďovania (t) verzus rýchlosť odstreďovania (rpm) na rôzne merné hmotnosti pôdy (ρ_s). R_t = 10 cm, $R_b - R_t$ = 10 cm, η = 8,95 × 10-^{3} g s-^{1} cm-^{1}a ρ_{aq} = 1,0 g.cm-^{3} pri 25 °C.

Obr. 1b



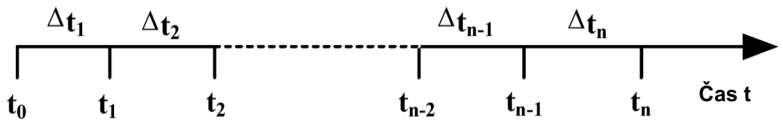
Variácie času odstreďovania (t) verzus rýchlosť odstreďovania (rpm) na rôzne výšky stĺpca zmesi v odstreďovacej skúmavke ($R_b - R_t$)= L; R_t = 10 cm; η = 0,89 × 10-^{3} g s-^{1} cm-^{1}, ρ_{aq} = 1,0 g.cm-^{3} pri 25 °C a ρ_s = 2,0 g cm-^{3}.

▼B

DODATOK 5

VÝPOČET ADSORPCIE A (%) A DESORPCIE D (%)

Časová schéma postupu je:



Pri všetkých výpočtoch sa predpokladá, že testovaná látka je stabilná a vo väčšej miere sa neadsorbuje na stenách nádoby.

ADSORPCIA A (A %)

a) *Paralelná metóda*

Percento adsorpcie sa vypočíta na každú testovanú skúmavku (i) v každom časovom bode (t_i) podľa rovnice:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Členy tejto rovnice sa dajú vypočítať takto:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

kde:

A_{ti} = percento adsorpcie [%] v časovom bode t_i;

$m_s^{ads}(t_i)$ = hmotnosť testovanej látky v pôde v čase t_i, analýza je (µg);

m_o = hmotnosť testovanej látky v testovanej skúmavke na začiatku testu (µg);

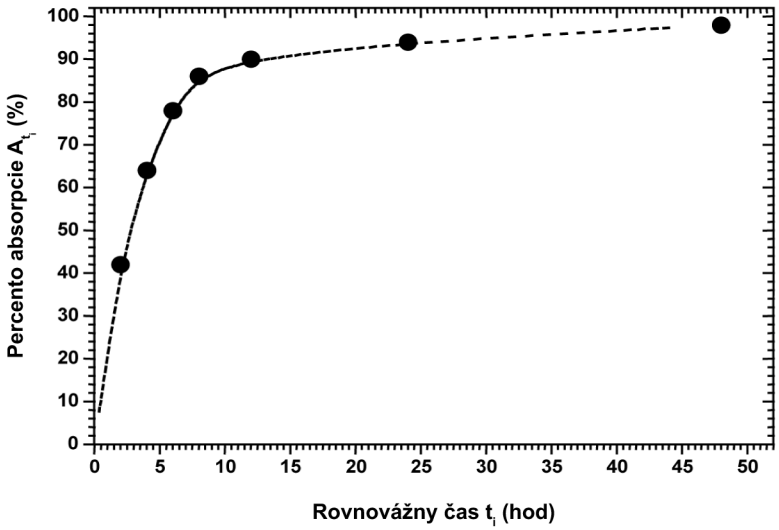
C_o = počiatočná hmotnostná koncentrácia testovaného roztoku, ktorý je v kontakte s pôdou (ug cm^{-3});

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = hmotnostná koncentrácia látky vo vodnej fáze v čase t_i, analýza je ukončená (µg cm^{-3}); táto koncentrácia sa stanovuje analyticky tak, že sa vezmú do úvahy hodnoty uvedené zo slepých pokusov

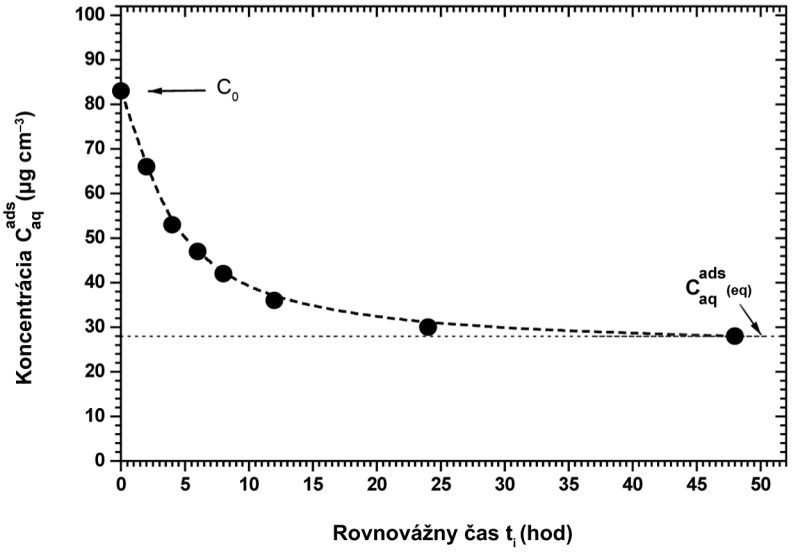
V_o = počiatočný objem testovaného roztoku, ktorý je v kontakte s pôdou (cm^3).

Hodnoty percenta adsopcie A_{t_i} alebo $C_{aq}^{ads}(t_i)$sú zobrazené verzus čas a čas, po ktorom sa dosiahne sorpčná rovnováha, je stanovený. Príklady takýchto grafov sú uvedené v obr. 1 a 2.



Obr. 1

Graf adsorpčnej rovnováhy



Obr. 2

Závislosť hmotnostnej koncentrácie testovanej látky vo vodnej fáze (C_{aq}) od času

▼B

b) *Sériová metóda*

Pri nasledujúcich rovniciach platí, že adsorpčná metóda sa vykonáva meraním testovanej látky v malých alikvotných častiach vodnej fázy za určitých časových intervalov.

— množstvo látky adsorbovanej na pôde počas každého časového intervalu sa vypočíta nasledovne:

— pre prvý časový interval $\Delta t_1 = t_1 - t_o$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— pre druhý časový interval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— pre tretí časový interval $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— pre tretí časový interval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A)}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— percento adsorpcie v každom časovom intervale $A_{\Delta t_i}$ sa vypočíta podľa nasledujúcej

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

pričom percento adsorpcie A_{t_i} v časovom bode t_i je dané vyššie uvedenou rovnicou:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Hodnoty percenta adsorpcie A_{t_i} alebo $A_{\Delta t_i}$ (s ohľadom na potreby štúdie) sú zaznamenané oproti času a čas, po ktorom sa dosiahla sorpčná rovnováha, je stanovený.

— V rovnovážnom čase t_{eq}:

— hmotnosť testovanej látky adsorbovanej na pôde je:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— hmotnosť testovanej látky v roztoku je:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— percento adsorpcie v rovnováhe je:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

Vyššie uvedené parametre sa definujú ako:

$m_s^{ads}(\Delta t_1)$, $m_s^{ads}(\Delta t_2)$, ..., $m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = hmotnosť látky adsorbovanej na pôde v časových intervaloch Δ_{t1}, Δ_{t2},..., Δ_{tn} jednotlivo (μg);

$m_s^{ads}(\Delta t_1)$, $m_s^{ads}(\Delta t_2)$, ..., $m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = hmotnosť látky meraná v alikvótnych častiach $v_a{}^A$v časových bodoch t_1, t_2, t_n jednotlivo (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = hmotnosť látky adsorbovanej na pôde v čase adsorpčnej rovnováhy (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = hmotnosť látky v roztoku v čase adsorpčnej rovnováhy (μg);

$v_a{}^A$ = objem alikvotnej časti, v ktorej je testovaná látka meraná (cm^3);

$A_{\Delta ti}$ = precento adsorpcie zodpovedajúce časovému intervalu Δt_i (%);

A_{eq} = precento adsorpcie v čase adsorpčnej rovnováhy (%).

DESORPCIA D (%)

Čas t_o, v ktorom začína experiment na určenie desorpčnej kinetiky, sa považuje ten moment, v ktorom je nahradený maximálny objem roztoku testovanej látky rovnakým objemom roztoku 0,01 M $CaCl_2$.

a) *Paralelná metóda*

V časovom bode t_i sa hmotnosť testovanej látky meria vo vodnej fáze vybratej zo skúmavky i (V_r^i) a desorbovaná hmotnosť sa vypočíta podľa vzorca:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{v_r^i}\right) - m_{aq}^{A} \quad (13)$$

Pri desorpčnej rovnováhe platí, že $t_i = t_{eq}$, a teda $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

Hmotnosť testovanej látky desorbovanej počas intervalu (Δt_i) je daná rovnicou:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Percento desorpcie sa vypočíta:

v časovom bode t_i podľa rovnice:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (15)$$

v časovom intervale (Δt_i) podľa rovnice:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (16)$$

kde:

D_{ti} = percento desorpcie v časovom bode t_i (%);

$D_{\Delta ti}$ = percento desorpcie zodpovedajúce časovému intervalu Δt_i (%);

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = hmotnosť testovanej látky desorbovanej v časovom bode t_i (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = hmotnosť látky desorbovanej na pôde v časovom intervale Δt_i (μg);

$m_m^{des}(t_i)$ = analyticky stanovená hmotnosť testovanej látky nameraná v časovom bode t_i a v roztoku V_r^i, ktorý bol analyzovaný (μg);

$m_{aq}{}^{A}$ = hmotnosť testovanej látky, ktorá zostala z adsorpčnej rovnováhy kvôli nedokončenej substitúcii objemu (μg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \qquad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = hmotnosť testovanej látky v roztoku v čase adsorpčnej rovnováhy (μg);

V_R = objem kalu odstráneného zo skúmavky po dosiahnutí adsorpčnej rovnováhy a nahradeného rovnakým objemom 0,01 M $CaCl_2$ (cm^3);

V_r^i = objem roztoku odohraného zo skúmavky i) na meranie testovanej látky v experimente desorpčnej kinetiky (cm^3).

Hodnoty desorpcie D_{ti}alebo $D_{\Delta t_i}$(podľa potrieb štúdie) sú zobrazené verzus čas a čas, po ktorom je dosiahnutá desorpčná rovnováha, je stanovený.

b) **Sériová metóda**

Nasledujúce rovnice zohľadňujú to, že adsorpčné postupy, ktoré predchádzali, boli uskutočnené meraním testovanej látky v malom alikvotnom objeme (v_a^A) vodnej fázy (sériová metóda v 1.9 Vykonanie testu). Predpokladá sa, že a) objem kalu odstráneného zo skúmavky po pokuse na získanie adsorpčnej kinetiky bol nahradený rovnakým objemom 0,01 M $CaCl_2$ roztoku (V_R) a b) celkový objem vodnej fázy, ktorá je v kontakte s pôdou (V_T), zostáva konštantná počas pokusu na získanie adsorpčnej kinetiky a je vyjadrená rovnicou:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \qquad (18)$$

▼B

časovom bode t_i:

— hmotnosť testovanej látky meraná v malom alikvotnom objeme (v_a^D) a desorbovaná hmotnosť sa vypočítajú podľa rovnice:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \tag{19}$$

— v desorpčvnej rovnováhy $t_i = t_{eq}$ a preto $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

— percento desorpcie D_{t_i} sa vypočíta podľa nasledujúcej rovnice:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{20}$$

V časovom intervale pre tretí časový interval (Δt_i):

— pre prvý časový interval $\Delta t_i = t_i - t_o$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \tag{21}$$

— pre druhý časový interval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right)$$

and

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right] \tag{22}$$

— pre n-tý časový interval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right] \tag{23}$$

and

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$$

Nakoniec, percento desorpcie v každom časovom intervale $D_{\Delta t_i}$ sa vypočíta pomocou nasledujúcej rovnice:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \tag{24}$$

zatiaľ čo percento desorpcie D_{t_i} v každom časovom bode t_i je dané rovnicou:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \tag{25}$$

▼B

kde sú vyššie uvedené parametre definované nasledovne:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = hmotnosť látky, ktorá zostáva absorbovaná na pôde po časových intervaloch Δt_1, Δt_2 ..., Δt_n jednotlivo (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{aq}^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = hmotnosť testovanej desorbovanej látky počas časových intervalov Δt_1, Δt_2 ..., Δt_n jednotlivo (μg);

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$,... , $m_m^{des}(t_n)$ = hmotnosť látky meranej v alikvótnej časti (v_a^D) v časovom bode Δt_1, Δt_2 ..., Δt_n jednotlivo (μg);

V_T = celkový objem vodnej fázy v kontakte s pôdou počas pokusu na získanie desorpčnej kinetiky vykonaného sériovou metódou (cm^3);

$m^A{}_{aq}$ = hmotnosť látky, ktorá zostala z adsorpčnej rovnováhy kvôli neukončenej substitúcii objemu (μg);

$$m_{aq}^{A} = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \qquad (26)$$

V_R = objem kalu odstráneného zo skúmavky po dosiahnutí adsorpčnej rovnováhy a nahradeného rovnakým objemom 0,01 M $CaCl_2$ solution (cm^3);

v_a^D = objem alikvotnej časti odobratej na analytické použitie zo skúmavky (i) počas pokusu na zistenie desorpčnej kinetiky vykonaného sériovou metódou (cm^3);

$$v_a^D \leq 0{,}02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

DODATOK 6

ADSORPCIA – DESORPCIA V PÔDE: PREHĽAD ÚDAJOV

Testovaná látka:

Testovaná pôda:

Hmotnostný obsah suchej pôdy (105 °C, 12h): ..... %

Teplota: ..... °C

Vhodnosť analytickej metódy

Odvážená pôda	g	
Hmotnosť suchej pôdy	g	
Objem roztoku $CaCl_2$	cm^3	
Menovitá koncentrácia finálneho roztoku	$\mu g\ cm^{-3}$	
Analytická koncentrácia finálneho roztoku	$\mu g\ cm^{-3}$	

Princíp použitej analytickej metódy:

Kalibrácia použitej analytickej metódy:

Testovaná látka:

Testovaná pôda:

Hmotnostný obsah suchej pôdy (105 °C, 12 h): .....%

Teplota: ..... °C

Druh analytickej metodológie: nepriam ☐ paralelná ☐ sériová ☐

priama ☐

Adsorpčný test: testované vzorky

	Symbol	Jednotky	Rovnovážny cas		Rovnovážny čas		Rovnovážny čas		Rovnovážny čas	
Skúmavka č.										
Odvážená pôda	—	g								
Pôda: suchá hmotnosť	$m_{pôda}$	g								
Objem vody v odváženej vode (vypočítany)	V_{ws}	cm^3								
Objem 0,01 M $CaCl_2$ roztoku v rovnovážnej pôde		cm^3								
Objem zásobného roztoku		cm^3								
Celkový objem vodnej fázy v kontakte s pôdou	V_0	cm^3								
Počiatočná koncentrácia testovaného roztoku	C_0	$\mu g\ cm^3$								
Hmotnosť testovanej látky na začiatku testu	m_0	µg								

▼B

	Symbol	Jednotky	Rovnovážny cas		Rovnovážny čas		Rovnovážny čas		Rovnovážny čas	
Po vytrepávaní a odstred'ovaní										
NEPRIAMA METÓDA										
Paralelná metóda										
Koncentrácia testovanej látky, vodná fáza, korekcia slepých pokusov	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Sériová metóda										
Nameraná hmotnosť testovanej látky v alikvotnom objeme V_a^A	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
PRIAMA METÓDA										
Hmotnosť testovanej látky adsorbovanej na pôde	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Vypočet adsorpcie										
Adsorpcia	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Hodnoty										
Koeficient adsorpcie	K_d	cm^3 g^{-1}								
Hodnoty										
Koeficient adsorpcie	K_{oc}	cm^3 g^{-1}								
Hodnoty										

Testovaná látka:

Testovaná pôda:

Hmotnostný obsah suchej pôdy (105 °C, 12 h): ..... %

Teplota: ..... °C

Test adsorpcie: slepé pokusy a kontrola

	Symbol	Jednotky	Slepý pokus		Slepý pokus		Kontrola	
Skúmavka č.								
Hmotnosť pôdy		g					0	0
Množstvo vody v odváženej pôde (vypočítané)		cm^3					—	—
Objem 0,01 M $CaCl_2$ pridaného roztoku		cm^3						
Objem zásobného roztoku pridanej testovanej látky		cm^3	0	0				
Celkový objem vodnej fázy (vypočítaný)		cm^3					—	—

▼B

	Symbol	Jednotky	Slepý pokus		Slepý pokus		Kontrola	
Počiatočná koncentrácia testovanej látky vo vodnej faze		µg cm^{-3}						

Po vytrepávaní a odstreďovaní

Koncentrácia vo vodnej faze		µg cm^{-3}						

Pozn. Pridajte kolónky, ak je to potrebné.

Testovaná látka:

Testovaná pôda:

Hmotnostný obsah suchej pôdy (105 °C 12 h): ..... %

Teplota: ..... °C

Hmotnostná bilancia

	Symbol	Jednotky				
Skúmavka č..						
Odvážená pôda	—	g				
Pôda: suchá hmotnosť	$m_{pôda}$	g				
Objem vody v odváženej pôde (vypočítané)	V_{WS}	ml				
Objem 0,01 M $CaCl_2$ roztoku v rovnovážnej pôde		ml				
Objem zásobného roztoku		cm^3				
Celkový objem vodnej fázy v kontakte s pôdou	V_0	cm^3				
Počiatočná koncentrácia testovaného roztoku	C_0	µg cm^{-3}				
Rovnovážny čas	—	h				

Po vytrebaní a odstred'ovaní

Koncentrácia testovanej látky vodná fáza, vrátane korekcie rovnováhy slepého pokusu	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}				
Rovnovážny čas	t_{eq}	h				

Prvé riedenie s rozpúšťadlom

Nahradený objem vodnej fázy	V_{rec}	cm^3				
Pridaný objem rozpúšťadla	ΔV	cm^3				

Prvá extrakcia s rozpúšťadlom

Signál analyzovaný v rozpúšťadle	S_{E1}	rôzne				
Koncentrácia testovanej látky v rozpúšťadle	C_{E1}	µg cm^{-3}				

▼B

	Symbol	Jednotky				
Hmotnosť látky extrahovanej z pôdy a zo stein nádoby	m_{E1}	µg				
Druhé riedenie s rozpúšťadlom						
Nahradený objem vodnej fázy	ΔV_s	cm^3				
Pridaný objem vodnej fázy	$\Delta V'$	cm^3				
Druhá extrakcia s rozpúšťadlom						
Signál analyzovaný v rozpúšťadle	S_{E2}	var.				
Koncentrácia testovanej látky v rozpúšťadle	C_{E2}	µg cm^{-3}				
Hmotnosť látky extrahovanej z pôdy a zo stein nádoby	m_{E2}	µg				
Celková hmotnosť testovanej látky extrahovanej v dvoch krokoch	m_E	µg				
Hmotnostná bilancia	MB	%				

Testovaná látka:

Testovaná pôda:

Hmotnostný obsah suchej pôdy (105 °C, 12 h): ..... %

Teplota: ..... °C

Adsorpčná izotermia

	Symbol	Jednotky								
Skúmavka č.										
Odvážená pôda	—	g								
Pôda: suchá hmotnosť	E	g								
Objem vody v odváženej pôde (vypočítané)	V_{WS}	cm^3								
Objem 0,01 M $CaCl_2$ roztoku v rovnovážnej pôde		cm^3								
Pridaný objem zásobného roztoku		cm^3								
Celkový objem vodnej fázy v kontakte s pôdou (vypočítaný)	V_0	cm^3								
Počiatočná koncentrácia testovaného roztoku	C_0	µg cm^{-3}								
Rovnovážny čas	—	h								

▼B

	Symbol	Jednotky								

Po vytrepaní a odstreďovaní

Koncentrácia látky vodná fáza, vrátane korekcie slepého pokusu	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Teplota		°C								
Adsorpčná hmotnosť na jednotke pôdy	$C_{s}^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Regresná analýza:

Hodnota K_F^{ads}:

Hodnota l/n:

Regresný koeficient r^2:

Testovaná látka:

Testovaná pôda:

Hmotnostný obsah suchej pôdy (105 °C, 12 h): .....%

Teplota: ..... °C

Druh analytickej metodológie: nepriama ☐ paralelná ☐ sériová ☐

Desorpčný test

		Symbol	Jednotka	Časový interval	Časový interval	Časový interval	Časový interval
Skúmavka č. vystupujúca z adsorpčného testu							
Hmotnosť látky adsorbovanej na pôde v čase adsorpčnej rovnováhy		$m_{s}^{ads}(eq)$	µg				
Nahradený objem vodnej fázy, nahradený objem 0,01 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Celkový objem vodnej fázy v kontakte s pôdou	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Hmotnosť testovanej látky odloženej počas adsorpčnej rovnováhy kvôli nedokončenej substitúcii objemu		m_{aq}^{A}	µg				

Desorpčná kinetika

Nameraná hmotnosť látky desorbovaná z pôdy v čase t_i		$m_{m}^{des}(t_i)$	µg				
Objem roztoku odobraný zo skúmavky i) s cieľom merania testovanej látky	PM	V_r^i	cm^3				
	SM	v_a^D	cm^3				
Hmotnosť látky desorbovanej z pôdy v čase t_i (nameraná)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Hmotnosť látky desorbovanej z pôdy v časovom intervale Δ_{ti} (nameraná)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Symbol	Jednotka	Časový interval	Časový interval	Časový interval	Časový interval
Percento desorpcie						
Desorpcia v čase t_i	Dt_i	%				
Desorpcia v časovom intervale Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Zdanlivý desorpčný koeficient	K_{des}					

PM: paralelná metóda
SM: sériová metóda

▼B

C.19. **ODHAD ADSORPČNÉHO KOEFICIENTU (K_{oc}) V PÔDE A V SPLAŠKOVOM KALE ZA POUŽITIA VYSOKOÚČINNEJ KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE/HPLC/**

1. **METÓDA**

Táto metóda je totožná s metódou OECD TG121 (2001).

1.1. ÚVOD

Sorpčné správanie sa látok v pôde a splaškových kaloch môže byť opísané cez experimentálne stanovené parametre v zmysle testovacej metódy C.18. Dôležitým parametrom je adsorpčný koeficient, ktorý je definovaný ako pomer medzi koncentráciou látky v pôde/splaškoch a koncentrácie látky vo vodnej fáze pri adsorpčnej rovnováhe. Adsorpčný koeficient normalizovaný na obsah organického uhlíka v pôde K_{oc} je vhodný indikátor väzbovej kapacity chemikálií na organické látky z pôdy/splaškov a dovoľuje urobiť porovnania rôznymi chemikáliami. Tento parameter môže byť odhadnutý cez korelácie s rozpustnosťou vo vode a n-oktanol/voda rozdeľovacím koeficientom (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7).

Experimentálna metóda opísaná v tomto teste používa vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu/HPLC/na odhadnutie adsorpčného koeficientu K_{oc} v pôde a splaškových kaloch (8). Odhady sú vyššej spoľahlivosti ako tie z QSAR výpočtov (9). Metóda odhadov nemôže úplne nahradiť série rovnovážnych experimentov používaných v testovacej metóde C.18. Avšak odhadnutý K_{oc} môže byť osožný pri vyberaní vhodných parametrov testu na štúdie adsorpcie/desorpcie podľa testovacej metódy C.18 vypočítaním K_d (distribučný koeficient) alebo K_f (Freundlichov adsorpčný koeficient) podľa rovnice 3 (pozri sekciu 1.2).

1.2. DEFINÍCIE

K_d: Distribučný koeficient je definovaný ako pomer rovnovážnej koncentrácie C rozpustenej testovacej látky v dvojfázovom systéme pozostávajúcom zo sorbentu/pôda alebo splaškové kaly/a pôdnej fázy; je to bezrozmerná veličina, keď koncentrácie v obidvoch fázach sú vyjadrené na základe hmotnosť/hmotnosť. V prípade koncentrácie vo vodnej fáze je daná na základe hmotnosť/objem, potom jednotky sú $ml.g^{-1}$.K_d sa môže meniť s vlastnosťou sorbentu a môže byť závislé od koncentrácie.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \; or \; \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \qquad (1)$$

kde:

$C_{pôda}$ = koncentrácia testovacej látky v pôde pri rovnováhe ($\mu g \, .g^{-1}$)

C_{kal} = koncentrácia testovacej látky v kale pri rovnováhe ($\mu g \, .g^{-1}$)

C_{aq} = koncentrácia testovacej látky vo vodnej fáze pri rovnováhe ($\mu g.g^{-1}$, $\mu g \, .ml^{-1}$)

▼B

K_f: Freundlichov adsorpčný koeficient je definovaný ako koncentrácia testovacej látky v pôde alebo splaškovom kale (x/m), keď rovnovážna koncentrácia C_{aq} vo vodnej fáze je rovná 1; jednotky sú $\mu g.g^{-1}$ sorbent. Hodnota sa môže meniť s vlastnosťami sorbentu.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (1)$$

kde:

x/m = množstvo testovacej látky x (μg) adsorbovanie na množstve sorbentu m (g) pri rovnováhe

l/n = nábeh Freundlichovej adsorpčnej izotermy

C_{aq} = koncentrácia testovacej látky vo vodnej fáze pri rovnováhe ($\mu g.ml^{-1}$)

$$At C_{aq} = 1;\ \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc}: Distribučný koeficient (K_d) alebo Freundlichov adsorpčný koeficient (K_f) normalizovaný na obsah organického uhlíka (f_{oc}) v sorbente, predovšetkým na neionizované chemikálie, je to vhodný indikátor na stupeň adsorpcie medzi látkou a sorbentom a umožňuje urobiť porovnania medzi rôznymi chemikáliami. V závislosti od rozmeru/jednotiek, v ktorých sú udávané (K_d a K_f, K_{oc}) môže byť bezrozmerný alebo mať jednotku ($ml.g^{-1}$) alebo ($\mu g\ .g^{-1}$) organickej látky.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} \left(\text{bezrozmzrný alebo ml} \cdot g^{-1}\right) \text{ alebo } \frac{K_f}{f_{oc}} \left(\mu g \cdot g^{-1}\right) \quad (3)$$

Vzťah medzi K_{oc} a K_d nie je vždy lineárny a preto K_{oc} hodnota sa môže meniť z pôdy na pôdu, ale ich variabilita je značne redukovaná porovnaním K_d alebo K_f hodnôt.

Adsorpčný koeficient (K_{oc}) je odvodený z kapacitného faktora (k") využívajúceho kalibračnú závislosť log k' versus log K_{oc} na vybraté referenčné zlúčeniny.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

kde:

t_R = HPLC retenčný čas testovacej a referenčnej látky (minúty)

t_o = HPLC mŕtvy čas (minúty) (pozri odsek 1.8.2)

P_{ow}: Rozdeľovaci koeficient na systém oktanol – voda je definovaný ako pomer koncentrácií rozpustených látok v n-oktanole a vo vode – je to bezrozmerná hodnota.

$$Pow = \frac{Coctanol}{Caq} (= Kow) \quad (5)$$

1.3. REFERENČNÉ LATKY

Štruktúrny vzorec, čistota a disociačná konštanta látok (ak je to vhodné) by mali byť známe pred použitím metódy. Informácia o rozpustnosti vo vode a v organických rozpúšťadlách, o rozdeľovacom koeficiente na systém oktanol – voda a hydrolyzačné charakteristiky sú vhodné.

▼B

Aby sme priviedli do vzájomného vzťahu FTPLC – retenčné údaje testovacej látky s jeho adsorpčným koeficientom, K_{oc}, bol stanovený kalibračný graf ako log K_{oc} = f (log k'). Mal by byť zostrojený minimálne so šiestich referenčných bodov, najmenej jeden bod nad a jeden pod očakávanou hodnotou na testovaciu látku. Presnosť metódy sa značne zlepší, ak sa použijú referenčné látky, ktorých štruktúra je príbuzná testovacej látke, štruktúre. Ak nie sú tieto údaje dostupné, potom je na užívateľovi, ktorý musí vybrať vhodné kalibračné látky. V tomto prípade bol vybraný obvyklejší set štruktúrovo heterogénnych látok. Látky a hodnoty K_{oc}, ktoré môžu byť použité, sú vypísané v dodatku v tabuľke 1 pre splaškové kaly a v tabuľke 3 pre pôdu. Výber iných kalibračných látok by mal byť opodstatnený.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

FTPLC je vykonávaná na analytických kolónach naplnených s komerčne dostupnou tuhou fázou kyanopropylom obsahujúcou lipofilické a pólové podiely. Je používaná mierne pólová stacionárna fáza zakotvená na kremičitanovej matrici.

– O – Si	– CH_2 – CH_2 – CH_2	– CN
silica	nepólová zložka	pólová skupina

Princíp testovacej metódy je podobný testovacej metóde A.8 (rozdeľovaci koeficient, FTPLC metóda). Zatiaľ čo v tom čase prechádza cez kolónu spolu s mobilnou fázou, testovacia látka je interaktívna so stacionárnou fázou. Dvojité zloženie stacionárnej fázy, ktorá má polárny aj nepolárny charakter, umožňuje interakcie pólových aj nepólových skupín v molekule podobnou cestou ako v prípade organickej látky v pôdach alebo v splaškovo kalových matriciach. Toto umožňuje utvoriť vzťah medzi retenčným časom na kolóne a adsorpčným koeficientom z organickej látky.

pH má značný vplyv na sorpčné správanie sa predovšetkým na pólové látky. Pre poľnohospodársku pôdu alebo nádrže čistiarní odpadových vôd pH sa normálne mení pH v rozmedzí pH = 5,5 – 7,5. Pre ionizovateľné látky by mali byť vykonané dva testy s obidvoma, ionizovanou a neionizovanou formou, vo vhodnom tlmiacom roztoku, ale iba v prípade, keď najmenej 10 % testovacej zlúčeniny bude disociované v rozmedzí pH od 5,5 do 7,5.

Odkedy sa využíva na vyhodnotenie len vzťah medzi retenciou na HPLC kolóne a adsorpčným koeficientom, nevyžaduje sa žiadna kvalitatívna analytická metóda a je potrebné iba stanovenie retenčného času. Ak je dostupný vhodný set referenčných látok a môžu byť použité štandardné experimentálne podmienky, metóda poskytuje rýchlu a účinnú cestu na odhad adsorpčného koeficientu K_{oc}.

1.5. APLIKOVATEĽNOST TESTU

HPLC metóda je aplikovateľná na chemické látky (neoznačené alebo označené), pre ktoré je dostupný vhodný detekčný systém (napr. spektrofotometer, radiačný detektor (a ktoré sú dostatočne stabilné počas trvania experimentu. Môže byť hlavne použitá na chemikálie, ktoré môžeme ťažko študovať pomocou iných experimentálnych systémov (napr. prchavé látky, ktoré nie sú rozpustné vo vode v koncentráciách, ktoré môžu byť merané analyticky. Látky s vysokou afinitou voči povrchu inkubačných systémov). Metóda môže byť použitá pri zmesiach, ktoré dávajú nerozlíšené elučné skupiny. V takomto prípade najvyšší a najnižší limit na hodnotu log K_{oc} pre zlúčeniny v zmesi by mal byť daný.

▼B

Nečistoty môžu niekedy spôsobiť problémy pri interpretácií výsledkov z HPLC, ale majú iba malý význam, ak testovacia látka je jednoznačne analyticky identifikovaná a oddelená od nečistôt.

Metóda je platná na látky v tabuľke 1 v dodatku a bola tiež aplikovaná na rôzne iné chemické látky prislúchajúce do nasledujúcich chemických skupín:

— aromatické amíny (napr. trifluralín, 4-chlóranilín, 3,5-dinitroanilín, 4-metylanilín, N-metylanilín, 1-naftylamín),

— estery aromatických karboxylových kyselín (napr. metylester kyseliny benzoovej, etylester kyseliny 3,5-dinitrobenzovej),

— aromatické uhľovodíky/napr. toluén, xylén, etylbenzén, nitrobenzén,

— estery aryloxyfenoxy propionóvej kyseliny (napr. diclofop-metyl, fenoxaprop-etyl, fenoxaprop-P-etyl),

— benzimidazol a imidazolové fungicídy (napr. carbendozim, fuberidazol, trianoxid),

— amidy karboxylových kyselín (napr. 2-chlórbenzamid, N,N-dimetylbenzamid, 3,5-dinitrobenzamid, N-metylbenzamid, 2-nitrobenzamid, 3-nitrobenzamid),

— chlórované uhľovodíky (napr. endosulfan, DDT, hexachlórbenzén, chintozén, 1,2,3-trichlórbenzén),

— organofosforečné insekticídy (napr. azinofos-metyl, disulfoton, fenamiphos, izofenfs, pyra-zofos, sulprofos, triazofos),

— fenoly (napr. fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentachlórofenol, 2,4,6-trichlórfenol, 1-naftol),

— deriváty fenylmočoviny (napr. izoproturon, monolinuron, pencycuron),

— pigmenty farbív (napr. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81)

— polyaromatické uhľovodíky (napr. acenaftén, naftalén),

— 1,3,5-trianzínové herbicídy (napr. prometrín, propazin, simazín, terbutrín),

— triazolové deriváty (napr. tebucanozol, triadimefon, tradimenol, triapentenol).

Táto metóda nie je použiteľná na látky, ktoré reagujú s hociktorým z eluentov alebo so stacionárnou fázou. Tiež nie je aplikovateľná na látky, ktoré reagujú špecifickým spôsobom s anorganickými zložkami (napr. formácia klastrových komplexov s ílovými minerálmi). Metóda nemusí fungovať na povrchovo aktívne látky, anorganické zlúčeniny a slabé alebo silné organické kyseliny a zásady. Hodnota log K_{oc} môže byť stanovená v rozmedzí od 1,5 do 5,0. Ionizovateľné látky musia byť merané za použitia tlmiacej mobilnej fázy, ale treba dbať, aby sa zabránilo zvážaniu tlmiacich zložiek roztoku alebo testovanej látky.

▼B

1.6. KRITÉRIÁ KVALITY

1.6.1. **Presnosť**

Obvykle môže byť adsorpčný koeficient testovacej látky odhadnutý v medziach ± 0,5 log jednotky hodnoty, stanovenej sériou rovnovážnej metódy (pozri tabuľka 1 v dodatku). Vyššia presnosť môže byť dosiahnutá, ak sú použité referenčné látky s podobnou štruktúrou ako testovacia látka.

1.6.2. **Opakovateľnosť**

Stanovenie by sa malo vykonať najmenej dvakrát. Hodnoty log K_{oc} odvodené z jednotlivých meraní by mali byť v rozmedzí 0,25 log jednotky.

1.6.3. **Reprodukovateľnosť**

Doteraz nadobudnutá skúsenosť v používaní metódy potvrdzuje jej platnosť. Overovanie HPLC metódy, pri ktorej bolo použitých 48 látok (väčšinou pesticídov), na ktoré boli spoľahlivé dáta K_{oc} v pôdach dostupné, získal sa korelačný koeficient R = 0,95 (10), (11).

Vykonal sa vnútrolaboratórny porovnávací test s 11 účastníckymi laboratóriami, aby sa zdokonalila validová metóda. Výsledky sú uvedené v tabuľke 2 v dodatku.

1.7. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.7.1. **Predbežný odhad adsorpčného koeficientu**

Rozdeľovači koeficient na systém oktanol/voda P_{ow} (= K_{ow}) a v určitej miere rozpustnosť vo vode môže byť použitý ako indikátor stupňa adsorpcie, predovšetkým pre neionizovateľné látky, a preto môže byť použitý na predbežné hľadanie rozsahu vhodných korelácií. Množstvo vhodných korelácií bolo publikovaných na niekoľko rôznych skupín chemikálií (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7).

1.7.2. **Zariadenie**

Vyžaduje sa kvapalinový chromatograf vybavený bezpulzovou pumpou a vhodným detekčným zariadením. Odporúča sa použitie dávkovacieho ventilu s dávkovacou slučkou. Môže byť použitá komerčná kyano-propylová chemicky viazaná silica na kremičitanovom základe (napr. Hypersil a Zorbax KN). Medzi injekčný/dávkovací/systém a analytickú kolónu môže byť umiestnená ochranná kolóna (predkolóna) z rovnakého materiálu ako analytická kolóna. Kolóny od rôznych dodávateľov sa môžu významne líšiť v ich separačnej účinnosti. Ako príklad – nasledujúci kapacitný faktor k'sa dosiahne: log k' > 0,0 pre log K_{oc} = 3,0 a log k' > - 0,4 pre log K_{oc} = 2,0. Ak použijeme ako mobilnú fázu metanol/voda v pomere 55 ku 45 %.

1.7.3. **Mobilné fázy**

Bolo testovaných niekoľko mobilných fáz a nasledujúce dve sú odporúčané:

— metanol/voda (55/45 % objemových),

— metanol/0,01 M citrátový tlmivý roztok pH = 6,0 (55/45 % objemových).

▼B

Metanol, destilovaná voda alebo citrátový tlmivý roztok – stupne pre HPLC sa používajú na prípravu elučného rozpúšťadla. Zmes je pred použitím odplynená. Použije sa izokratické eluovanie. Ak zmesi etanol/voda nie sú vhodné, môžeme odskúšať iné zmesi organická látka/voda, napr. etanol/voda alebo acetonitril/voda. Pre iónové zlúčeniny sa odporúča používať tlmiace roztoky, aby sa stabilizovalo pH roztoku. Pozor treba dávať, aby sme sa vyhli vyzrážaniu soli alebo znečisteniu kolóny, čo sa môže vyskytnúť pri niektorých zmesiach organická fáza/tlmivý roztok.

Nemôžu byť používané žiadne aditíva, pretože môžu ovplyvniť sorpčné vlastnosti stacionárnej fázy, takže zmeny stacionárnej fázy môžu byť ireverzibilné. Z tohto dôvodu je dané, že experimenty, v ktorých sa používajú aditíva, sa vykonávajú na separátnych kolónach.

1.7.4. **Rozpúšťadlá**

Testovacie a referenčné látky by mali byť nerozpustné v mobilnej fáze.

1.8. VYKONANIE TESTU

1.8.1 **Podmienky testu**

Teplota počas merania by mala byť zapisovaná. Veľmi odporúčame používať oddelene kolónu s kontrolovanou teplotou, aby sa zistili konštantné podmienky počas kalibrácie, chodu na odhad a merania testovacej látky.

1.8.2. **Stanovenie mŕtveho času to**

Na stanovenie mŕtveho času t_o môžu byť použité dve rôzne metódy (pozri odsek 1.2).

1.8.2.1. *Stanovenie mŕtveho času to v zmysle homologického radu.*

Tento postup bol preverený, aby poskytoval spoľahlivú a štandardizovanú hodnotu t_o – mŕtveho času. Podrobne pozri testovaciu metódu A.8: rozdeľovací koeficient (n-oktanol/voda), HPLC metóda.

1.8.2.2. *Stanovenie mŕtveho času pomocou inertnej látky, ktorá nie je zadržiavaná na kolóne.*

Táto technika je založená na nastreknutí roztoku formamidu, močoviny alebo dusičňanu sodného. Meranie je potrebné vykonať najmenej dvakrát.

1.8.3. **Stanovenie retenčného času tR**

Retenčné látky by mali byť vybraté ako bolo popísané v odseku 1.3. Môžu byť nadávkované ako zmiešané štandardy na stanovenie ich retenčných časov. Bolo potvrdené, že retenčný čas každého referenčného štandardu je neovplyvnený prítomnosťou iných referenčných štandardov. Kalibrácia by sa mala vykonávať v pravidelných intervaloch najmenej dvakrát denne, aby sme vysvetlili neočakávané zmeny v účinnosti kolóny. Kalibrácia – nadávkovanie kalibračnej zmesi. Kalibračnú zmes by sme mali nadávkovať pred a po dávkovaní testovacej látky, aby sme si potvrdili, že retenčné časy sa neposúvajú. Testovacie látky sa dávkujú osobitne v množstve tak malom ako je to možné, aby sme sa vyhli preťaženiu kolóny a stanovia sa retenčné časy.

▼B

Aby sme zvýšili spoľahlivosť merania, stanovenie by malo byť vykonané najmenej dvakrát. Hodnota log K_{oc} získaná z jednotlivých meraní by mala spadať do rozmedzia 0,25 log jednotky.

1.8.4. **Vyhodnotenie**

Kapacitné faktory k' sú vypočítané z mŕtveho času to a retenčných časov t_R vybraných referenčných látok podľa rovnice 4/pozri odsek 12/. log k' údaje referenčných látok sú uvedené oproti ich log K_{oc} hodnotám na sériu rovnovážnych pokusov/experimentov/daných v tabuľke 1 a 3 v dodatku. Využívajúc tento graf je hodnota log k' testovacej látky potom použitá na stanovenie jeho hodnoty log K_{oc}. Ak aktuálne výsledky ukazujú, že log K_{oc} testovacej látky je mimo kalibračný rozsah, test by sa mal zopakovať s použitím inej vhodnej testovacej látky.

2. **ÚDAJE A SPRÁVA**

Správa musí zahŕňať nasledujúce informácie:

— identitu testovacích alebo referenčných látok a ich čistotu, hodnotu pKa, ak je relevantná,

— opis zariadenia a pracovné podmienky, napr. typ a rozmery analytickej predkolóny, spôsob detekcie, mobilnú fázu (pomer zložiek a pH), rozsah teplôt počas merania,

— mŕtvy čas a metódu použitú na jeho stanovenie,

— množstvá testovacích a referenčných látok vstupujúcich do kolóny,

— retenčné časy referenčných zlúčenín použitých na kalibráciu,

— detaily získanej regresnej krivky (log k' vs log K_{oc}) a graf regresnej krivky,

— priemer retenčných údajov a odhad d log K_{oc} hodnoty na testovaciu zlúčeninu,

— chromatogramy.

3. **POUŽITÁ LITERATÚRA**

(1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1 67.

(3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, s. 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, s. 227 – 231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, s. 297 – 312.

▼B

(6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, pp. 831 – 832.

(7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, s. 833 – 846.

(8) W. Kôrdel, 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), s. 121 – 128.

(9) M. Mueller, W. Kôrdel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), s. 2493 – 2504.

(10) W. Kôrdel, 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), s. 2341 – 2352.

(11) B. von Oepen, W. Kôrdel, 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, s. 285 – 304.

(12) W. Kôrdel, G. Kotthoff, J. Muller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), s. 1373 – 1384.

▼B

DODATOK

Tabuľka 1

Porovnanie Koc hodnôt na pôdne a splaškové kaly a vypočítané hodnoty podľa skríningovej HPLC metódy [1] [2]

Látka	Číslo CAS	log K_{oc} splaškové kaly	log K_{oc} HPL C	Δ	log K_{oc} pôdy	log K_{oc} HPL C	Δ
atrazín	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
fention	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
fenantrén	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
fenyl ester kyseliny benzoovej	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
benzamid	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-nitrobenzamid	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
acetanilíd	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
anilín	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-dichlóranilín	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), s. 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), s. 107 – 119.

Tabuľka 2

Výsledky laboratórnych porovnávacích testov (11 zúčastnených laboratórií) vykonaných s cieľom vylepšiť a potvrdiť platnosť HPLC-metódu [1]

Látka	Číslo CAS	log K_{oc}	K_{oc}	log K_{oc}
		[OECD 106]	[HPLC-metóda]	
atrazín	1912-24-9	1,81	78 + 16	1,89
monuron	150-68-5	1,99	100 + 8	2,00
triapentenol	77608-88-3	2,37	292 + 58	2,47
linuron	330-55-2	2,59	465 + 62	2,67
fention	55-38-9	3,31	2062 + 648	3,31

[1] W. Kördel, G. Kotthoff, J. Miiller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), s. 1373 – 1384.

▼B

Tabuľka 3

Odporúčané referenčné látky na skríningovú HPLC metódu vychádzajúcu z adsorpčných údajov na pôdu

Referenčná látka	Číslo CAS	log Koc hodnoty dávok	číslo Koc údajov	log S.D.	Zdroj
acetanilid	103-84-4	1,25	4	0,48	[a]
fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	[a]
2-nitrob enzamid	610-15-1	1,45	3	0,90	[b]
N, N-dimetylmenzamid	611-74-5	1,52	2	0,45	[a]
4-metylbenzamid	619-55-6	1,78	3	1,76	[a]
metylbenzoan	93-58-3	1,80	4	1,08	[a]
atrazín	1912-24-9	1,81	3	1,08	[c]
isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	[c]
3-nitrobenzamid	645-09-0	1,95	3	1,31	[b]
anilín	62-53-3	2,07	4	1,73	[a]
3,5-dinitrobenzamid	121-81-3	2,31	3	1,27	[b]
carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	[c]
triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	[c]
triazooxid	72459-58-6	2,44	3	1,66	[c]
triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	[c]
linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	[c]
naftalén	91-20-3	2,75	4	2,20	[a]
endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	[c]
metfiocarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	[c]
acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	[a]
1,2,3 -trichlorbenzén	87-61-6	3,16	4	1,40	[a]
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	[a]
fention	55-38-9	3,31	3	2,49	[c]
priama červeň 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	[a]
pyrazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	[c]
α-endosulfán	959-98-8	4,09	5	3,74	[c]
diclofop-metyl	51338-27-3	4,20	3	3,77	[c]
fenantrén	85-01-8	4,09	4	3,83	[a]
basic blue 41 zmes	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, 285-304.
[c] Údaje poskytnuté priemyslom.

▼M7

C.20. REPRODUKČNÝ TEST NA *DAPHNIA MAGNA*

ÚVOD

Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 211 (2012). Usmernenia OECD na vykonávanie testov sa pravidelne revidujú a aktualizujú vzhľadom na vedecký pokrok. Usmernenie na vykonávanie reprodukčného testu 211 vychádza z časti II usmernenia na vykonávanie testu 202, v ktorej sa uvádza reprodukčný test na *Daphnia* sp. (1984). Všeobecne sa uznáva, že údaje získané na základe testov vykonaných podľa uvedeného usmernenia TG 202 sa môžu líšiť. Z tohto dôvodu sa v záujme vytvorenia lepšej testovacej metódy vynaložilo značné úsilie zamerané na identifikáciu dôvodov tejto variability. Usmernenie na vykonanie testov 211 vychádza z výsledkov týchto výskumných činností, kruhových testov a validačných štúdií vykonaných v rokoch 1992 (1), 1994 (2) a 2008 (3).

Toto sú hlavné rozdiely medzi pôvodnou verziou usmernenia na vykonávanie reprodukčného testu (TG 202, 1984) a jeho druhou verziou (TG 211, 1998):

— odporúča sa použiť druh *Daphnia magna*,

— test trvá 21 dní,

— pri polostatickom teste sa počet jedincov, ktoré sa majú použiť pri každej testovanej koncentrácii, znížil z aspoň 40 jedincov, podľa možnosti rozdelených do štyroch skupín po desiatich jedincoch, na aspoň 10 jedincov držaných samostatne (hoci v prípade prietokových testov možno použiť rôzne plány testu),

— v súvislosti s testovacím médiom a podmienkami kŕmenia sa sformulovali špecifickejšie odporúčania,

— toto sú hlavné rozdiely medzi druhou verziou usmernenia na vykonávanie reprodukčného testu (TG 211, 1998) a touto verziou:

— doplnil sa dodatok 7 s cieľom v prípade potreby opísať postupy identifikácie pohlavia novonarodených jedincov; v súlade s predchádzajúcimi verziami tejto testovacej metódy je voliteľným sledovaným parametrom pomer pohlaví,

— hodnota závislej premennej – počet žijúcich potomkov na rodičovského jedinca sa doplnila o ďalšiu závislú premennú týkajúcu sa reprodukcie dafnií, t. j. celkový počet žijúcich potomkov na konci testu na rodičovskú dafniu na začiatku testu, čím sa z analýzy vyradia prípady náhodnej a/alebo mimovoľnej úmrtnosti rodičovských jedincov. Účelom ďalšej závislej premennej je zosúladiť túto závislú premennú s ďalšími reprodukčnými testovacími metódami uskutočňovanými na bezstavovcoch. Okrem toho v súvislosti s touto závislou premennou možno v tejto testovacej metóde odstrániť zdroj chybovosti, a to konkrétne účinok mimovoľnej a/alebo náhodnej úmrtnosti rodičovských jedincov v prípade jej výskytu počas obdobia expozície,

— v prípade EC_x (napr. EC10 alebo EC50), ako aj prístupu NOEC/LOEC, sa začlenili aj ďalšie štatistické usmernenia týkajúce plánu testu a spracovania výsledkov,

— zavádza sa limitný test.

V dodatku 1 sa uvádzajú definície.

PRINCÍP TESTU

Prvotným cieľom testu je posúdiť účinok chemikálií na reprodukčný výstup *Daphnia magna*. Mladé samice uvedeného druhu (rodičovské jedince), ktoré sú na začiatku testu mladšie ako 24 hodín, sú vystavené testovanej chemikálii pridávanej do vody v rôznych koncentráciách. Test trvá 21 dní. Na konci testu sa posúdi celkový počet narodených živých potomkov. Reprodukčný výstup rodičovských jedincov možno vyjadriť rôznymi spôsobmi (napr. počet žijúcich potomstva vyprodukovaného na jedinca za deň od prvého dňa, keď bolo spozorované potomstvo). Vykazovanie reprodukčného výstupu by sa však malo

▼M7

uskutočňovať popri vykazovaní celkového počtu živých mláďat na konci testu. Z dôvodu špecifického plánu polostatického testu v porovnaní s inými testovacími metódami týkajúcimi sa reprodukcie bezstavovcov je zároveň možné stanoviť počet živých potomkov jednotlivých rodičovských jedincov. Na rozdiel od iných testovacích metód týkajúcich sa reprodukcie bezstavovcov možno vďaka tomuto testu zabezpečiť, že ak počas testovacieho obdobia dôjde k náhodnému a/alebo mimovoľnému úhynu rodičovského jedinca, z posudzovaných údajov možno vylúčiť ním vyprodukované potomstvo. Ak sa teda u replikátov vystavených účinkom chemikálie vyskytne rodičovská úmrtnosť, malo by sa zvážiť, či v prípade danej úmrtnosti ide o zvyčajnú reakciu na koncentráciu, napr. v prípade významnej regresie reakcie na koncentráciu testovanej chemikálie s pozitívnym sklonom (na tento účel sa môže použiť štatistický test ako Cochranov a Armitageov test trendu). Ak úmrtnosť nie je reakciou na koncentráciu, potom by sa dané replikáty s rodičovskou úmrtnosťou mali z analýzy výsledkov testu vylúčiť. Ak úmrtnosť je reakciou na koncentráciu, rodičovská úmrtnosť by sa mala pripísať účinku testovanej chemikálie a replikáty by sa z analýzy nemali vylúčiť. Ak rodičovský jedinec uhynie počas testu, t. j. náhodne v dôsledku nesprávneho zaobchádzania alebo nehody, prípadne uhynie mimovoľne v dôsledku nevysvetliteľnej udalosti, ktorá nesúvisela s účinkom testovanej chemikálie, alebo ak vysvitne, že posudzovaný jedinec je samec, potom sa replikát vylúči z analýzy (viac informácií sa uvádza v bode 51). Toxické účinky testovanej chemikálie na reprodukčný výstup sa vyjadrujú buď ako EC_x, a to prostredníctvom dosadzovania údajov do vhodného modelu a základe nelineárnej regresie s cieľom odhadnúť koncentráciu, ktorá by spôsobila x % zníženie reprodukčného výstupu, alebo sa vyjadrujú ako hodnota NOEC/LOEC (4). *Testované koncentrácie by mali podľa možnosti zahŕňať najnižšiu z použitých účinných koncentrácií (napr. EC_{10}), čo znamená, že táto hodnota sa vypočíta pomocou interpolácie, a nie extrapolácie*.

Zaznamenať by sa mal aj počet rodičovských jedincov, ktorí prežili, a čas narodenia prvého potomstva. Preskúmať možno aj iné s danou chemikáliou súvisiace účinky na parametre, ako sú napríklad rast (napr. dĺžka) a možná inherentná rýchlosť rastu populácie (pozri bod 44).

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

Pri výbere vhodných testovacích koncentrácií v reprodukčných testoch môžu byť užitočné výsledky testu akútnej toxicity (pozri kapitolu C.2 tejto prílohy: Test akútnej imobilizácie dafnií *Daphnia* sp.), ktorý sa uskutočnil s použitím druhu *Daphnia magna*. Je potrebné poznať rozpustnosť testovanej chemikálie vo vode a jej tlak pary, pričom by k dispozícii mala byť spoľahlivá analytická metóda na kvantifikáciu chemikálie v testovacích roztokoch so známou mierou výťažnosti a kvantifikačným limitom.

Medzi informácie o testovanej chemikálii, ktoré môžu byť užitočné pri stanovovaní testovacích podmienok, patrí štruktúrny vzorec, čistota chemikálie, stabilita na svetle, stabilita za podmienok testovania, pKa, P_{ow} a výsledky testov na ľahkú biodegradovateľnosť [pozri kapitolu C.4 (Stanovenie „ľahkej“ biodegradovateľnosti) a kapitolu C.29 (Ľahká biodegradovateľnosť – CO_2 v hermeticky uzavretých nádobách) tejto prílohy].

PLATNOSŤ TESTU

Aby bol test platný, pri kontrole(-ách) by sa mali splniť tieto kritériá na vykonanie testu:

— úmrtnosť rodičovských jedincov (samice rodu *Daphnia*) nesmie na konci testu presiahnuť 20 %;

— priemerný počet živých potomkov na jedného rodičovského jedinca, ktoré na konci testu prežili, je ≥ 60.

Poznámka: Rovnaké validačné kritérium(20 %) možno uplatniť aj v prípade náhodnej a mimovoľnej rodičovskej úmrtnosti v prípade kontrol, ako aj každej z testovaných koncentrácií.

▼M7

OPIS METÓDY

Prístrojové vybavenie

Testovacie nádoby a iné prístroje, ktoré prichádzajú do styku s testovacími roztokmi, by mali byť celé zo skla alebo iného chemicky inertného materiálu. Testovacie nádoby sú obvykle sklenené kadičky.

Okrem toho budú potrebné niektoré z týchto zariadení alebo všetky uvedené zariadenia:

— oximeter (s mikroelektródou alebo iným vhodným vybavením na meranie rozpusteného kyslíka vo vzorkách s malým objemom),

— primerané zariadenie na kontrolu teploty,

— pH meter,

— vybavenie na stanovenie tvrdosti vody,

— vybavenie na stanovenie celkového obsahu organického uhlíka (TOC) vo vode alebo zariadenie na stanovenie chemickej spotreby kyslíka (COD),

— primeraný prístroj na kontrolovanie svetelného režimu a meranie intenzity svetla.

Testované organizmy

Druh, ktorý sa má použiť v teste je *Daphnia magna* Straus ([1]).

Klony by sa mali podľa možnosti identifikovať na základe genotypov. Z výskumu (1) vyplynulo, že reprodukčná schopnosť klonu A (ktorý pochádza z IRCHA vo Francúzsku) (5), stabilne vyhovuje kritériu validity, ktorým je priemerná hodnota ≥ 60 žijúcich potomkov na rodičovského jedinca, ktorý prežíva, ak je chovaný za podmienok opísaných v tejto testovacej metóde. Akceptovateľné sú však aj iné klony, a to za podmienky, že predmetná kultúra dafnií preukázateľne spĺňa kritériá validity na účely testu.

Na začiatku testu by mali byť jedince mladšie ako 24 hodín a nemali by pochádzať z prvého potomstva. Mali by pochádzať zo zdravej populácie (t. j. nemali by vykazovať príznaky stresu, akými sú napríklad vysoká úmrtnosť, prítomnosť samcov a efípií, oneskorené liahnutie prvých potomkov, jedince so zmenou sfarbenia atď.) Zásobná populácia by sa mala držať v chovných podmienkach (svetlo, teplota, médium, kŕmenie a počet jedincov na jednotku objemu) podobných tým, ktoré sa použijú pri teste. Ak sa rastové médium dafnií, ktoré sa má použiť v teste, líši od média, ktoré sa vyskytuje pri bežnej kultúre dafnií, s cieľom zabrániť spôsobovaniu stresu rodičovským jedincom sa odporúča pred testom zaradiť aklimatizačné obdobie trvajúce obvykle okolo troch týždňov (t. j. jedna generácia).

Testovacie médium

V tomto teste odporúčame použiť plne definované médium. Vďaka tomu sa možno vyhnúť použitiu ťažko charakterizovateľných prídavných látok (napr. rias, pôdnych extraktov), čím sa následne zlepšujú možnosti štandardizácie medzi laboratóriami. Zistilo sa, že na tento účel sú vhodné Elendtove médiá M4 (6) a M7 (pozri dodatok 2). Akceptovateľné sú však aj iné médiá, napr. (7), (8), a to za podmienky, že úžitkovosť kultúry dafnií preukázateľne spĺňa kritériá validity testu.

([1]) Použiť sa môžu aj iné druhy dafnií za podmienky, že spĺňajú príslušné validačné kritériá (v rámci kontrol by kritérium validity týkajúce sa reprodukčného výstupu malo platiť pre *všetky* pre druhy dafnií.) V prípade použitia iných druhov čeľade dafniovité by sa mal daný druh jasne identifikovať a jeho použitie opodstatniť.

▼M7

Ak sa používajú médiá, ktoré obsahujú nedefinované prídavné látky, tieto prídavné látky by sa mali jasne špecifikovať, pričom by sa mali v skúšobnom protokole poskytnúť informácie o zložení, a to predovšetkým s prihliadnutím na obsah uhlíka, keďže práve obsah uhlíka môže prispievať k poskytovanej potrave. Odporúča sa, aby sa stanovil celkový obsah organického uhlíka (TOC) a/alebo chemická spotreba kyslíka (COD) v zásobnom roztoku organickej prídavnej látky a aby sa uskutočnil odhad výsledného vplyvu na TOC/COD v testovacom médiu. Ďalej sa odporúča, aby úrovne TOC v médiu (t. j. pred pridaním rias) boli pod 2 mg/l (9).

Pri testovaní chemikálií s obsahom kovov je dôležité rozpoznať, že vlastnosti testovacieho média (t. j. tvrdosť, chelačná kapacita) môžu mať súvislosť s toxicitou testovanej chemikálie. Z tohto dôvodu je vhodné úplne definované médium. V súčasnosti sú však jedinými plne definovanými médiami, ktoré sú známe ako vhodné na dlhodobý chov kultúry *Daphnia magna*, Elendtove médiá M4 a M7. Obidve médiá obsahujú chelatotvorné činidlo EDTA. Zo skúseností vyplýva (2), že ak sa reprodukčný test uskutoční v médiách M4 a M7, „zjavná toxicita“ kadmia je vo všeobecnosti nižšia ako vtedy, ak sa uvedený test uskutoční v médiách, ktoré činidlo EDTA neobsahujú. Preto sa na testovanie chemikálií s obsahom kovov neodporúčajú médiá M4 a M7. Treba sa vyhnúť aj iným médiám s obsahom známych chelatotvorných činidiel. V prípade chemikálií, ktoré obsahujú kovy, sa odporúča použiť alternatívne médium, napríklad sladkú tvrdú vodu, rekonštituovanú v súlade s predpismi organizácie ASTM (9), ktorá neobsahuje žiadne činidlá EDTA. Táto kombinácia sladkej tvrdej vody, rekonštituovanej v súlade s normami organizácie ASTM, a extraktu z rias (10) je pre dlhodobý chov kultúry *Daphnie magna* (2) vhodná.

Koncentrácia rozpusteného kyslíka by na začiatku testu a počas neho mala presahovať 3 mg/l. Hodnota pH by sa mala pohybovať v rozmedzí od 6 do 9 a zvyčajne by sa v žiadnom teste nemala líšiť o viac ako 1,5 jednotiek. Odporúča sa tvrdosť nad 140 mg/l (v podobe $CaCO_3$). Testy na tejto úrovni a vyšších úrovniach preukazujú reprodukčnú schopnosť v súlade s kritériami validity (11) a (12).

Testovacie roztoky

Testovacie roztoky so zvolenou koncentráciou sa zvyčajne pripravujú zriedením zásobného roztoku. Zásobné roztoky by sa mali pripravovať podľa možnosti bez použitia akýchkoľvek rozpúšťadiel alebo dispergujúcich látok, a to miešaním alebo pretrepávaním testovanej chemikálie v testovacom médiu za použitia mechanických postupov vrátane trepania, miešania alebo utrazvuku, prípadne iných vhodných metód. Pred zavedením testovaných organizmov sa odporúča, aby sa testované systémy vystavili pôsobeniu koncentrácií testovanej chemikálie, ktorá sa má použiť v štúdii, a to tak dlho, ako je to potrebné na preukázanie stabilných expozičných koncentrácií. Ak sa testovaná chemikália ťažko rozpúšťa vo vode, malo by sa postupovať v súlade s postupmi uvedenými v usmernení OECD o zaobchádzaní s problematickými látkami (13). Používaniu rozpúšťadiel alebo dispergujúcich látok by sa síce malo vyhýbať, no v niektorých prípadoch môže byť ich použitie nevyhnutné v záujme vytvorenia zásobného roztoku, ktorý má vhodnú koncentráciu z hľadiska dávkovania.

Okrem testovania s testovacími koncentráciami treba testovanie uskutočniť s kontrolou vody na riedenie s vhodným počtom replikátov a v prípade nutnosti aj s kontrolou rozpúšťadla s vhodným počtom replikátov. V teste by sa mali používať len rozpúšťadlá alebo dispergujúce látky, v prípade ktorých sa na základe skúmania potvrdilo, že nemajú žiadne významné alebo majú len minimálne účinky na hodnotu závislej premennej. V bode (13) sa uvádzajú príklady

▼M7

vhodných rozpúšťadiel (napr. acetón, etanol, metanol, dimetylformamid a trietylénglykol) a dispergujúcich látok (napr. Cremophor RH40, metylcelulóza 0,01 % a HCO-40). V prípade použitia rozpúšťadla alebo dispergujúcej látky by ich finálna koncentrácia nemala presahovať 0,1 ml/l (13) a s výnimkou kontrolny vody na riedenie by vo všetkých testovacích nádobách mala byť rovnaká koncentrácia. Je však potrebné usilovať sa o minimalizovanie koncentrácie rozpúšťadla.

POSTUP

Podmienky expozície

Trvanie

Test trvá 21 dní.

Nasadzovanie

Rodičovské jedince sa držia jednotlivo, teda jeden na testovaciu nádobu zvyčajne s objemom 50 až 100 ml (v prípade *Daphnia magna*). V nádobách možno použiť aj menšie objemy média, a to najmä v prípade menších dafnií, napr. druhu *Ceriodaphnia dubia*), pokiaľ na testovanie nie je potrebný prietokový model testu.

Z hľadiska uspokojenia požiadaviek analytického postupu použitého na stanovenie koncentrácie testovanej chemikálie možno niekedy budú musieť byť potrebné väčšie objemy, hoci na účely chemickej analýzy je prípustné aj združenie replikátov. Ak sa použijú objemy väčšie ako 100 ml, možno bude treba zvýšiť dávkovanie potravy s cieľom zabezpečiť dafniám primeranú dostupnosť potravy a súlad s validačnými kritériami.

Testované jedince

V rámci polostatického testu sa pri každej testovanej koncentrácii používa najmenej 10 jednotlivo držaných jedincov a v kontrolných sériách najmenej 10 jednotlivo držaných jedincov.

Ukázalo sa, že v prípade prietokových testov je vhodné 40 jedincov rozdeliť do štyroch skupín po 10 na každú testovanú koncentráciu (1). Môže sa použiť aj menší počet jedincov, pričom sa odporúča minimálne 20 jedincov na koncentráciu rozdelených do dvoch alebo viacerých replikátov s rovnakým počtom jedincov (napr. štyri replikáty, každý s piatimi dafniami). Pripomíname, že v rámci testov, pri ktorých sú jedince umiestnené v skupinách, nebude možné zo štatistickej analýzy vylúčiť žiadne potomstvo v prípade mimovoľnej alebo náhodnej rodičovskej úmrtnosti, keď sa už začala reprodukcia, a preto by sa v týchto prípadoch mal reprodukčný výstup vyjadriť ako celkový počet žijúcich potomkov vyprodukovaných na rodiča, ktorý bol prítomný na začiatku testu.

Priradenie ovplyvňovaných skupín testovacím nádobám a všetky nasledujúce činnosti by sa mali uskutočňovať v náhodnom slede. Ak by sa takto nepostupovalo, prípadná zaujatosť by sa dala interpretovať ako účinok koncentrácie. Najmä vtedy, ak sa s experimentálnymi jednotkami zaobchádza v poradí podľa ovplyvňovania alebo koncentrácie, mohlo by v dôsledku niektorých časovo závislých účinkov, akými sú únava obsluhy alebo iná chyba, dôjsť pri vyšších koncentráciách k výraznejším účinkom. Okrem toho, ak existuje pravdepodobnosť, že počiatočné alebo environmentálne podmienky testu (napr. umiestnenie v laboratóriu) môžu ovplyvniť výsledky testu, potom by sa malo zvážiť blokové usporiadanie testu.

Kŕmenie

Pri polostatickom teste by sa kŕmenie malo podľa možnosti vykonávať denne, najmenej však trikrát za týždeň (napr. čo zodpovedá výmenám média). Prihliadať by sa malo na možné riedenie expozičných koncentrácií pridaním potravy, pričom by sa mu malo v maximálnej možnej miere zabrániť prostredníctvom dostatočne koncentrovanej suspenzie rias. Odchýlky od tohto stavu by sa mali zaznamenávať (napr. pri prietokových testoch).

Počas testu by mala potrava rodičovských jedincov pozostávať zo živých buniek rias týchto druhov: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (predtým *Selenastrum capricornutum*) a *Desmodesmus subspicatus* (predtým *Scenedesmus subspicatus*). Množstvo podávanej potravy by malo vychádzať z množstva organického uhlíka (C) dodaného každému rodičovskému jedincovi. Z výskumu (14) vyplýva, že pokiaľ ide o *Daphnia magna*, úrovne dávok v rozmedzí 0,1 až 0,2 mg C/dafnia/deň postačujú na dosiahnutie požadovaného množstva živého

▼M7

potomstva, čím sa zabezpečuje splnenie validačných kritérií testu. Danú dávku potravy možno podávať buď počas celého trvania testu v konštantnej miere, alebo si možno zvoliť podávanie potravy v nižšej miere a počas testu túto mieru zvyšovať v záujme zohľadnenia rastu rodičovských jedincov. Aj v tomto prípade by mala daná dávka potravy po celý čas zostať v odporúčanom rozpätí 0,1 až 0,2 mg C/dafnia/deň.

Ak sa na účely stanovenia požadovanej úrovne dávky potravy použijú náhradné merania, ako napr. počet buniek rias alebo absorbcia svetla (t. j. z dôvodov praktickosti, pretože meranie obsahu uhlíka je časovo náročné), každé laboratórium by si malo vytvoriť svoj vlastný nomogram súvisiaci s náhradným meraním týkajúcim sa obsahu uhlíka dotknutej kultúry rias (rady týkajúce sa tvorby nomogramov sa uvádzajú v dodatku 3). Nomogram by sa mal kontrolovať najmenej raz do roka a v prípade zmien podmienok týkajúcich sa danej kultúry rias aj častejšie. Zistilo sa, že absorpcia svetla je v porovnaní s počtom buniek vhodnejší náhradný parameter, pokiaľ ide o obsah uhlíka (15).

Dafniám by sa mala podávať koncentrovaná suspenzia rias, aby sa minimalizoval objem média s kultúrou rias prenášaného do testovacích nádob. Koncentrovanie rias možno dosiahnuť odstreďovaním v centrifúge, po ktorom nasleduje opätovná suspenzácia v médiu s kultúrou dafnií.

Svetlo

Svetelné pôsobenie v trvaní 16 hodín s intenzitou nepresahujúcou 15 až 20 μE $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ meranou na hladine vody v nádobe. V prípade prístrojov na meranie svetla, ktoré sú kalibrované v luxoch, rozmedzie 1 000 až 1 500 luxov pre studené biele svetlo takmer zodpovedá odporúčanej intenzite svetla 15 až 120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

Teplota

Teplota testovacieho média by sa mala pohybovať v rozmedzí 18 až 22 °C. Podľa možnosti by sa však v prípade ani jedného testu nemala daná teplota líšiť viac ako o 2 °C v rámci týchto hraničných hodnôt (t. j. 18 až 20, 19 až 21 alebo 20 až 22 °C), ktoré predstavujú denné rozpätie. Možno bude na účely monitorovania teploty vhodné použiť ďalšiu testovaciu nádobu.

Prevzdušňovanie

Testovacie nádoby by sa počas testu nemali prevzdušňovať.

Plán testu

Test na zistenie rozsahu

V prípade potreby sa vykoná test na zistenie rozsahu, napríklad s piatimi koncentráciami testovanej chemikálie a dvoma replikátmi na každú expozíciu a kontrolu. Pri rozhodovaní o rozsahu koncentrácií, ktoré sa majú použiť na test na zisťovanie rozsahu, môžu byť užitočné aj dodatočné informácie o akútnej toxicite týkajúcej sa druhu *Daphnia* a/alebo iných vodných organizmov, ktoré vyplývajú z testov s podobnými chemikáliami alebo z literatúry.

Test na zistenie rozsahu trvá 21 dní alebo dostatočný čas, v priebehu ktorého možno spoľahlivo predpovedať úrovne účinkov. Na konci testu sa posudzuje reprodukcia dafnií. Mal by sa zaznamenať počet rodičovských jedincov a výskyt potomstva.

Hlavný test

Zvyčajne by malo byť k dispozícii aspoň päť testovaných koncentrácií vrátane účinnej koncentrácie (napr. e.g. EC_x), ktoré by mali byť zoradené do geometrických sérií so separačným faktorom, ktorý podľa možnosti nepresahuje hodnotu 3,2. Na každú testovanú koncentráciu by sa mal používať vhodný počet replikátov (pozri body 24 – 25). Ak sa použije menej ako päť koncentrácií, je

▼M7

potrebné uviesť zdôvodnenie. V testovacom médiu by sa chemikálie nemali testovať nad hranicou ich maximálnej rozpustnosti. Pred vykonaním testu sa odporúča zvážiť štatistickú silu daného plánu testu a použitie vhodných štatistických metód (4). Pri stanovovaní rozsahu koncentrácií treba mať na pamäti:

i) Pri odhade EC_x v súvislosti s účinkami na reprodukciu je vhodné použiť dostatočné koncentrácie s cieľom stanoviť EC_x s vhodnou úrovňou spoľahlivosti. Použité testované koncentrácie by mali prednostne zahŕňať hodnotu EC_x, aby sa táto hodnota$_x$ zistila na základe interpolácie, a nie extrapolácie. Výhodou ďalej uvedených štatistických analýz je skutočnosť, že sa v nich vyskytuje viacero testovaných koncentrácií (napr. 10), menší počet replikátov každej koncentrácie (napr. 5, vďaka čomu sa celkový počet nádob udržiava na konštantnej úrovni) a 10 kontrol.

ii) Pri odhade LOEC a/alebo NOEC by mala mať najnižšia testovaná koncentrácia natoľko nízku úroveň, aby reprodukčný výstup pri danej koncentrácii nebol výrazne nižší ako výstup z kontroly. Ak to tak nie je, test by sa mal zopakovať so zníženou najnižšou koncentráciou.

iii) Pri odhade LOEC a/alebo NOEC by mala mať najvyššia testovaná koncentrácia natoľko vysokú úroveň, aby reprodukčný výstup pri danej koncentrácii bol výrazne nižší ako výstup z kontroly. Ak to tak nie je, test by sa mal zopakovať so zvýšenou najvyššou koncentráciou, pokiaľ sa ako najvyššia testovaná koncentrácia v úvodnom teste nepoužila maximálna požadovaná testovaná koncentrácia pre testovanie chronických účinkov (t. j. 10 mg/l).

Ak sa v rámci testu na zistenie rozsahu pri najvyššej koncentrácii (napr. pri 10 mg/l) nepozorujú žiadne účinky, alebo ak je vysoko pravdepodobné, že testovaná chemikália bude vykazovať nízku/žiadnu toxicitu vzhľadom na absenciu toxicity vo vzťahu k iným organizmom a/alebo bude vykazovať nízke/žiadne vychytávanie, reprodukčný test možno vykonať ako limitný test s použitím testovanej koncentrácie, a to napr. 10 mg/l, ako aj kontroly. Na účely testovanej, ako aj ovplyvňovanej skupiny, by sa malo použiť desať replikátov. V prípade potenciálnej potreby vykonať limitný test v prietokovom systéme je vhodné použiť menej replikátov. Vďaka limitnému testu sa preukáže, že pri koncentračnom limite nedochádza k žiadnemu štatisticky významnému účinku, no ak dôjde k zaznamenaniu účinkov, zvyčajne je potrebné vykonať úplný test.

Kontroly

Okrem testovanej série by sa mala zrealizovať jedna kontrolná séria s testovacím médiom a v prípade relevantnosti aj jedna kontrolná séria obsahujúca rozpúšťadlo alebo dispergujúcu látku. V prípade použitia rozpúšťadla alebo dispergujúcej látky by ich koncentrácia mala byť rovnaká ako koncentrácia použitá v nádobách obsahujúcich testovanú chemikáliu. Mal by sa použiť náležitý počet replikátov (pozri body 23 – 24.).

Ak sa test realizuje správne, variačný koeficient v blízkosti priemerného počtu žijúcich potomkov vyprodukovaných na jedného rodičovského jedinca v kontrolnej vzorke(-ách) by mal byť $\leq$ 25 %, pričom by sa mal zaznamenať na účely testovacích plánov, v ktorých sa používajú samostatne držané jedince.

Obnova testovacieho média

Frekvencia obnovy testovacieho média závisí od stability testovanej chemikálie, mala by sa však uskutočňovať najmenej trikrát za týždeň. Ak je z predbežných testov stability (pozri bod 7) zrejmé, že počas maximálneho obdobia obnovy (t. j. troch dní) je koncentrácia testovanej chemikálie nestabilná (t. j. jej hodnota sa pohybuje mimo rozpätia 80 – 120 % nominálnej hodnoty počiatočnej nameranej koncentrácie alebo klesne pod 80 % tejto koncentrácie), mala by sa zvážiť možnosť častejšej obnovy média alebo použitia prietokového testu.

▼M7

Ak sa pri polostatických testoch realizuje obnova média, pripraví sa druhá séria testovacích nádob, do ktorých sa (napríklad sklenou pipetou s vhodným priemerom) prenesú rodičovské jedince. Objem média preneseného s dafniami by sa mal minimalizovať.

Pozorovania

Výsledky pozorovaní vykonaných počas testu by sa mali zaznamenať do tabuliek (pozri príklady v dodatkoch 4 a 5). V prípade potreby ďalších meraní (pozri bod 44) sa môžu vyžadovať dodatočné pozorovania.

Potomstvo

Potomstvo vyprodukované každým rodičovským jedincom by sa malo podľa možnosti odobrať a denne spočítať, a to od výskytu prvého potomka, s cieľom zabrániť potomkom konzumovať potravu určenú pre rodičovského jedinca. Na účel tejto metódy je potrebné zrátať iba počet žijúcich potomkov, zaznamenať však treba aj výskyt nevyliahnutých vajíčok alebo uhynutých potomkov.

Úmrtnosť

Úmrtnosť u rodičovských jedincov by sa mala zaznamenávať podľa možnosti denne alebo aspoň tak často, ako sa počíta potomstvo.

Ďalšie parametre

Hoci účelom tejto metódy je v prvom rade posudzovanie účinkov na reprodukčný výstup, možno prostredníctvom nej dostatočne kvantifikovať aj iné účinky, čo poslúži pri štatistickej analýze. Zaznamenávať možno reprodukčný výstup na rodičovského jedinca, ktorý prežil, t. j. počet žijúcich potomkov vyprodukovaných počas testu na preživšieho rodičovského jedinca. Táto hodnota sa môže porovnať s hlavnou závisle premennou (na začiatku testu zmeraný reprodukčný výstup rodičovského jedinca, ktorý počas testu mimovoľne alebo náhodne neuhynul). Ak sa u replikátov vystavených účinkom chemikálie vyskytne rodičovská úmrtnosť, malo by sa zvážiť, či v prípade danej úmrtnosti ide o zvyčajnú reakciu na koncentráciu, napr. v prípade významnej regresie reakcie na koncentráciu testovanej chemikálie s pozitívnym sklonom (na tento účel možno použiť štatistický test ako Cochranov a Armitageov testu trendu). Ak úmrtnosť nie je reakciou na koncentráciu, potom by sa dané replikáty s rodičovskou úmrtnosťou mali z výsledkov testu vylúčiť. Ak úmrtnosť je reakciou na koncentráciu, rodičovská úmrtnosť by sa mala pripísať účinku testovanej chemikálie a replikáty by sa nemali z analýzy výsledku testu vylúčiť. Mimoriadne žiaduce sú merania rastu, keďže prinášajú informácie o možných subletálnych účinkoch, ktoré možno potenciálne využiť popri samotných reprodukčných meraniach; na konci testu sa odporúča meranie dĺžky rodičovských jedincov (t. j. dĺžky tela bez análnej plutvy). Medzi ďalšie merateľné alebo vypočítateľné parametre patrí čas, dokedy sa nenarodí prvé potomstvo (a nasledujúce potomstvá), počet a veľkosť potomstiev na jedinca, počet nevyliahnutých vajíčok, výskyt novonarodených jedincov samčieho pohlavia (OECD 2008) alebo efípií a prípadne inherentný pomer populačného rastu (pozri definície v dodatku 1 a dodatku 7 pre určenie pohlavia novonarodených jedincov).

Frekvencia analytických stanovovaní a meraní

Koncentrácia kyslíka, teplota, tvrdosť vody a hodnoty pH by sa mali merať aspoň raz týždene v čerstvom, ako aj starom médiu, v kontrole(-ách) a pri najvyššej koncentrácii testovanej chemikálie.

Počas testu sa v pravidelných intervaloch stanovujú koncentrácie testovanej chemikálie.

Pri polostatických testoch, kde sa očakáva, že koncentrácia testovanej chemikálie zostane v rozmedzí ± 20 % nominálnej hodnoty (t. j. v rozsahu 80 až 120 %, pozri body 6, 7 a 39), sa odporúča, aby sa analyzovala aspoň najvyššia a najnižšia testovaná koncentrácia, teda v momente, keď sa daná chemikália práve pripraví

▼M7

a v čase jej obnovy, a to v priebehu prvého týždňa testu (t. j. analýzy by sa mali vykonať na vzorke z rovnakého roztoku – v čase, keď je čerstvo pripravený a v čase jeho obnovy.) Tieto stanovenia by sa potom mali opakovať aspoň v týždňových intervaloch.

V prípade testov, kde sa neočakáva, že koncentrácia testovanej chemikálie zostane v rozmedzí ± 20 % nominálnej hodnoty, je potrebné analyzovať všetky testované koncentrácie, a to v čase, keď sa chemikália čerstvo pripraví a v čase jej obnovy. No v prípade testov, kde meraná počiatočná koncentrácia testovanej chemikálie síce nie je v rozmedzí ± 20 % nominálnej hodnoty, avšak možno dostatočne preukázať, že počiatočné koncentrácie sú opakovateľné a stabilné (t. j. v rozsahu 80 až 120 % počiatočnej koncentrácie), by sa chemické stanovenia mohli znížiť v priebehu testovacích týždňov 2 a 3 na roztoky s najvyššou a najnižšou testovanou koncentráciou. Koncentrácie testovanej chemikálie pred obnovou je v každom prípade potrebné stanoviť len v jednej replikačnej nádobe pri každej testovanej koncentrácii.

V prípade použitia prietokového testu je vhodné uplatniť podobný režim odberu vzoriek, ako je režim opísaný pri polostatickom teste (meranie týkajúce sa „starých“ roztokov sa však v tomto prípade neuplatňuje). V záujme zachovania stability testovaných koncentrácií však možno odporučiť, aby sa počas prvého týždňa zvýšil počet odberov (napríklad 3 série meraní). Pri týchto typoch testov by sa mal denne kontrolovať prietok riedidla a testovanej chemikálie.

Ak existujú dôkazy o tom, že sa počas testu zachovala uspokojivá koncentrácia testovanej chemikálie v rozmedzí ± 20 % nominálnej koncentrácie alebo počiatočnej meranej koncentrácie, potom výsledky môžu vychádzať z nominálnych hodnôt alebo z počiatočných nameraných hodnôt. Ak je odchýlka od nominálnej alebo nameranej počiatočnej koncentrácie väčšia ako ± 20 percent, výsledky by sa mali vyjadriť ako časovo vážený priemer (pozri usmernenia pre výpočet v dodatku 6).

ÚDAJE A PREZENTÁCIA VÝSLEDKOV

Spracovanie výsledkov

Cieľom tohto testu je stanoviť účinok testovanej chemikálie na reprodukčný výstup. Na každú testovaciu nádobu (t. j. replikát) by sa mal vypočítať celkový počet živých potomkov na rodičovského jedinca. Okrem toho možno vypočítať úroveň reprodukcie na základe produkcie živého potomstva na rodičovského jedinca, ktorý prežil. Ekologicky najvýznamnejšou závisle premennou je však celkový počet živého potomstva vyprodukovaného rodičovským jedincom, ktorý počas testu náhodne ([1]) alebo mimovoľne ([2]) neuhynul. Ak počas testu dôjde k náhodnému alebo mimovoľnému úhynu rodičovského jedinca, alebo vysvitne, že ide o jedinca mužského pohlavia, potom sa replikát vylúči z analýzy. Pri analýze sa potom bude vychádzať zo zníženého počtu replikátov. Ak sa u replikátov vystavených účinkom chemikálie vyskytne rodičovská úmrtnosť, malo by sa zvážiť, či v prípade danej úmrtnosti ide o zvyčajnú reakciu na koncentráciu, napr. v prípade významnej regresie reakcie na koncentráciu testovanej chemikálie s pozitívnym sklonom (na tento účel možno použiť štatistický test ako Cochranov a Armitageov testu trendu). Ak úmrtnosť nie je reakciou na koncentráciu, potom by sa dané replikáty s rodičovskou úmrtnosťou mali z výsledkov testu vylúčiť. Ak úmrtnosť je reakciou na koncentráciu, rodičovská úmrtnosť by sa mala pripísať účinku testovanej chemikálie a replikáty by sa nemali z analýzy výsledku testu vylúčiť.

Možno teda konštatovať, že ak sa na vyjadrenie daných účinkov využívajú hodnoty LOEC a NOEC alebo EC_x, pri výpočte účinku na reprodukciu sa odporúča použiť obe uvedené závisle premenné, t. j.

([1]) Náhodná úmrtnosť: úmrtnosť, ktorá nesúvisí s pôsobením chemikálie, ale k nej došlo v dôsledku náhodnej udalosti (t. j. príčina je známa)

([2]) Mimovoľná úmrtnosť: úmrtnosť bez známej príčiny, ktorá nesúvisí s pôsobením chemikálie

▼M7

— celkový počet živého potomstva vyprodukovaného rodičovským jedincom, ktorý počas testu náhodne alebo mimovoľne neuhynul, a

— počet žijúceho potomstva vyprodukovaného na preživšieho rodičovského jedinca;

a potom použiť ako konečný výsledok najnižšiu hodnotu LOEC a NOEC alebo EC_x vypočítanú pomocou ktorejkoľvek z týchto dvoch závisle premenných.

Pred použitím štatistickej analýzy, napríklad postupov ANOVA, porovnania ovplyvňovaných skupín s kontrolnou skupinou formou Studentovho t-testu, Dunnettovho testu, Williamsovho testu alebo Jonckheereovho-Terpstrovho zostupného testu sa odporúča, aby sa v záujme splnenia požiadaviek daného štatistického testu v prípade potreby zvážila transformácia údajov. Za neparametrické alternatívy možno považovať Dunnovej test alebo Mannov a Whitneyho test. V prípade priemerných hodnôt jednotlivých ovplyvňovaní sa vypočítajú 95 % intervaly spoľahlivosti.

Jedným z validačných kritérií, ktoré by sa malo dokumentovať a zaznamenávať, je počet rodičovských jedincov, ktorí prežili, v neovplyvňovaných kontrolných skupinách. V záverečnej správe by mali byť zaznamenané aj všetky ďalšie škodlivé účinky, napr. abnormálne správanie a toxikologicky významné zistenia.

EC_x

Hodnoty EC_x vrátane ich príslušných dolných a horných hraníc spoľahlivosti sa vypočítajú pomocou vhodných štatistických metód (napr. metódy logistickej alebo Weibullovej funkcie, Spearman-Karberovej metódy s orezanými údajmi alebo metódy jednoduchej interpolácie). Na účely výpočtu hodnoty EC10, EC_{50} alebo akejkoľvek inej hodnoty EC_x, by sa mal kompletný súbor údajov podrobiť regresnej analýze.

NOEC/LOEC

Ak je cieľom štatistickej analýzy určenie hodnoty NOEC/LOEC, na daný účel by sa mali uplatniť vhodné štatistické metódy podľa dokumentu OECD č. 54 o súčasných prístupoch k štatistickej analýze údajov o ekotoxicite: usmernenie týkajúce sa uplatňovania (4). Vo všeobecnosti sa nepriaznivé účinky testovanej chemikálie v porovnaní s kontrolnou skupinou analyzujú pomocou jednostranného testu hypotézy s $p \leq 0,05$.

Normálnu distribúciu a homogenitu rozptylu možno otestovať pomocou vhodného štatistického testu, napr. Shapiro-Wilkovho testu, resp. Leveneho testu ($p \leq 0,05$). Môže sa vykonať jednosmerná analýza ANOVA a následný viacnásobný porovnávací test. Na výpočet významných rozdielov ($p \leq 0,05$) medzi kontrolnými skupinami a rôznymi koncentráciami testovanej chemikálie, ak existujú, sa môžu použiť viacnásobné porovnávania (napr. Dunnettov test) alebo zostupné testovania trendov (napr. Williamsov test alebo Jonckheereov-Terpstrov zostupný test) [výber odporúčaného testu podľa usmerňovacieho dokumentu OECD 54 (4)]. Inak možno na stanovenie hodnôt NOEC a LOEC použiť neparametrické metódy (napr. Bonferroniho U-test podľa Holma alebo Jonckheereov-Terpstrov test trendov).

Limitný test

Ak sa vykonal limitný test (porovnanie kontroly a len jednej ovplyvňovanej skupiny) a boli splnené predpoklady parametrických testovacích postupov (normalita, homogenita), metrické reakcie možno vyhodnotiť pomocou Studentovho testu (t-testu). Ak tieto podmienky nie sú splnené, možno použiť t-test s nerovnomerným rozptylom (napr. Welchov test) alebo neparametrický test, napríklad Mannov a Whitneyho U-test.

Na stanovenie významných rozdielov medzi kontrolnými skupinami (kontrolná skupina a kontrolná skupina s rozpúšťadlom alebo dispergujúcou látkou) možno replikáty z každej kontrolnej skupiny otestovať podľa opisu pre limitný test. Ak sa v týchto testoch nezistia významné rozdiely, všetky replikáty kontrolnej skupiny a kontrolnej skupiny s rozpúšťadlom možno spojiť. V opačnom prípade by sa všetky ovplyvňované skupiny mali porovnať s kontrolnou skupinou s rozpúšťadlom.

▼M7

Skúšobný protokol

Skúšobný protokol musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje chemikálie vrátane čistoty.

Testovaný druh:

— klon (či bol geneticky typizovaný), dodávateľ alebo zdroj (ak je známy) a použité kultivačné podmienky. Použitie iného druhu ako *Daphnia magna* by sa malo zaznamenať a odôvodniť.

Testovacie podmienky:

— použitý testovací postup (t. j. polostatický test alebo prietokový test, objem, nasádzanie dafnií – počet na liter),

— fotoperióda a intenzita svetla,

— plán testu (napr. počet replikátov, počet rodičovských jedincov na replikát),

— podrobné informácie o použitom rastovom médiu,

— v prípade použitia ďalšieho organického materiálu – údaje o zložení, zdroji, spôsobe prípravy, TOC/COD v zásobných roztokoch, odhad výslednej hodnoty TOC/COD v testovacom médiu,

— podrobné informácie o kŕmení vrátane množstva (v mg C/dafnia/deň) a o harmonograme, napr. druh potravy vrátane, pokiaľ ide o riasy, špecifického názvu (druhu) a kmeňa (ak je známy) a kultivačných podmienok),

— metóda prípravy zásobných roztokov a frekvencia obnovy (v prípade použitia treba uviesť rozpúšťadlo alebo dispergujúcu látku).

Výsledky:

— výsledky z predbežných štúdií stability testovanej chemikálie,

— nominálne testované koncentrácie a výsledky všetkých analýz s cieľom stanoviť koncentráciu testovanej chemikálie v testovacích nádobách (pozri príklad tabuľku v dodatku 5); mala by sa zaznamenať aj miera výťažnosti a kvantifikačný limit,

— kvalita vody v testovacích nádobách (t. j. pH, teplota a koncentrácia rozpusteného kyslíka a TOC a/alebo COD a podľa potreby aj tvrdosť) (pozri príklad tabuľky v dodatku 4);

— úplná evidencia o počte živých potomkov vyprodukovaných na jedného rodičovského jedinca počas testu (pozri príklad tabuľky v dodatku 4);

— počet prípadov úhynu v prípade rodičovských jedincov a deň, keď došlo k uhynutiu (pozri príklad tabuľky v dodatku 4);

— variačný koeficient týkajúci sa kontroly reprodukčného výstupu (na základe celkového počtu žijúcich potomkov na živého rodičovského jedinca na konci testu);

— graf znázorňujúci závislosť celkového počtu živých potomkov vyprodukovaných na rodičovského jedinca v každom replikáte okrem rodičovských jedincov, pri ktorých existuje pravdepodobnosť, že počas testu náhodne alebo mimovoľne uhynuli, od koncentrácie testovanej chemikálie;

▼M7

— podľa potreby graf znázorňujúci závislosť celkového počtu živých potomkov vyprodukovaných na rodičovského jedinca, ktorý prežil, v každom replikáte, od koncentrácie testovanej chemikálie;

— v prípade potreby najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC) pre reprodukciu vrátane opisu používaných štatistických postupov s uvedením, aký rozsah zisteného účinku možno očakávať (ešte pred začatím experimentu sa môže na tento účel vykonať analýza sily), a koncentráciu bez pozorovaného účinku (NOEC) pre reprodukciu; informácie o tom, ktorá závisle premenná sa použila na výpočet LOEC a NOEC (buď ako celkový počet živých potomkov na materský organizmus, ktorý počas testu náhodne alebo mimovoľne neuhynuli, alebo ako celkový počet žijúcich potomkov na preživší materský organizmus) a v prípade potreby by sa mali zaznamenať aj LOEC alebo NOEC týkajúce sa úmrtnosti rodičovských jedincov;

— v prípade potreby hodnota EC_x týkajúca sa reprodukcie a intervaly spoľahlivosti (napr. 90 % alebo 95 %) a graf vhodného modelu použitého na výpočet, sklon krivky znázorňujúcej závislosť reakcie od koncentrácie s ňou súvisiaca štandardná chyba;

— ďalšie pozorované biologické účinky alebo merania: treba zaznamenať všetky ďalšie biologické pozorované alebo merané účinky (napr. rast rodičovských jedincov) vrátane každého primeraného odôvodnenia;

— vysvetlenie pri všetkých odchýlkach od testovacej metódy.

LITERATÚRA

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.) p. 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

Dodatok 1

DEFINÍCIE

Na účely tejto testovacej metódy sa používajú tieto definície:

Náhodná úmrtnosť: úmrtnosť, ktorá nesúvisí s pôsobením chemikálie, ale ku ktorej došlo v dôsledku náhodnej udalosti (t. j. príčina je známa).

Chemikália: látka alebo zmes.

ECx: koncentrácia testovanej chemikálie rozpustenej vo vode, ktorá spôsobí x % zníženie reprodukcie dafnií v rámci vymedzenej dĺžky expozície.

Mimovoľná úmrtnosť: úmrtnosť bez známej príčiny, ktorá nesúvisí s pôsobením chemikálie.

Inherentná rýchlosť rastu populácie: meranie rastu populácie, ktoré zahŕňa reprodukčný výstup a úmrtnosť špecifickú pre isté obdobie života (1), (2), (3). V prípade populácií v ustálenom stave sa rovná nule. V prípade rastúcich populácií pôjde o kladnú a v prípade zmenšujúcich sa populácií o zápornú hodnotu. Zmenšujúca sa populácia je samozrejme neudržateľná a napokon povedie k vyhynutiu jedincov.

Detekčný limit: najnižšia detegovateľná, nie však kvantifikovateľná koncentrácia.

Kvantifikačný limit: najnižšia koncentrácia, ktorú možno kvantitatívne zmerať.

Najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC): najnižšia testovaná koncentrácia nameraná v rámci danej dĺžky expozície, pri ktorej sa pozoruje, že chemikália má štatisticky významný účinok na reprodukciu a rodičovskú úmrtnosť (pri $p < 0,05$) pri porovnaní s kontrolou. Škodlivý účinok všetkých testovaných koncentrácií nad úrovňou LOEC by však mal byť rovnaký alebo väčší ako účinky pozorované pri LOEC. Ak tieto dve podmienky nie sú splnené, je potrebné poskytnúť úplné vysvetlenie, akým spôsobom sa zvolila LOEC (a teda aj NOEC).

Úmrtnosť: jedinec sa zaznamená ako uhynutý, keď sa nepohybuje, napr. keď nie je schopný plávať alebo ak sa nepozoruje žiadny pohyb končatín alebo postabdomenu do 15 sekúnd po jemnom potrasení testovacej nádoby. (Ak sa použije iná definícia, mala by sa uviesť spolu s odkazom na ňu.)

Koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC): testovaná koncentrácia nameraná v rámci danej dĺžky expozície bezprostredne pod úrovňou LOEC, ktorá pri porovnaní s kontrolou nemá štatisticky významný účinok ($p < 0,05$).

Potomstvo: mladé dafnie vyprodukované rodičovskými jedincami v priebehu testu.

Rodičovské jedince: samice dafnií prítomné na začiatku testu, ktorých reprodukčný výstup je predmetom štúdie.

Reprodukčný výstup: počet žijúcich potomkov vyprodukovaných na rodičovského jedinca v testovacom období

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

LITERATÚRA

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

Dodatok 2

PRÍPRAVA PLNE DEFINOVANÝCH ELENDTOVÝCH MÉDIÍ M7 A M4

Aklimatizácia na Elendtove médiá M7 a M4

V niektorých laboratóriách sa zaznamenali ťažkosti pri priamom prenose dafnií do médií M4 (1) a M7. Na druhej strane sa však dosiahol určitý úspech s postupnou aklimatizáciou, t. j. prenosom z vlastného média do 30 % Elendtovho média, potom do 60 % Elendtovho média a následne do 100 % Elendtovho média. Dĺžka aklimatizačného obdobia môže dosiahnuť až jeden mesiac.

Príprava

Stopové prvky

Vo vode vykazujúcej vhodnú čistotu, napríklad v deionizovanej, destilovanej, prípadne vo vode získanej reverznou osmózou, sa najprv pripravia samostatné zásobné roztoky (I) jednotlivých stopových prvkov. Z týchto rôznych zásobných roztokov (I) sa pripraví druhý osobitný zásobný roztok (II), ktorý obsahuje všetky stopové prvky (kombinovaný roztok), t. j.:

Zásobný roztok (roztoky) I (jedna látka)	Množstvo pridané do vody	Koncentrácia (vzhľadom na médium M4)	Na prípravu kombinovaného zásobného roztoku II pridajte do vody toto množstvo zásobného roztoku I	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000-násobná	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7 210	20 000-násobná	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-násobná	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-násobná	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3040	20 000-násobná	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-násobná	1,0	0,25
Mo $Na_2O_4 \cdot 2\ H_2O$	1260	20 000-násobná	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	335	20 000-násobná	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-násobná	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	20 000-násobná	1,0	1,0
KI	65	20 000-násobná	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000-násobná	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000-násobná	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	5 000	2 000-násobná	—	—
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 991	2 000-násobná	—	—
Roztok Na_2EDTA, ako aj roztok FeSO4, sa pripravia samostatne, zlejú sa spolu a ihneď sa ošetria v autokláve. Týmto sa získa:				
roztok Fe-EDTA		1 000-násobná	20,0	5,0

▼**M7**

Médiá M4 a M7

Médiá M4 a M7 sa pripravia pomocou zásobného roztoku II, makroživín a vitamínov takto:

	Množstvo pridané do vody	Koncentrácia (vzhľadom na médium M4)	Množstvo zásobného roztoku pridané na účely prípravy média	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
zásobný roztok II (kombinované stopové prvky)		20-násobná	50	50
zásobné roztoky s obsahom makroživín (jedna látka)				
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1 000-násobná	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	2 000-násobná	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-násobná	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1000-násobná	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	5000-násobná	0,2	0,2
$NaNO_3$	2740	10 000-násobná	0,1	0,1
KH_2PO_4	1430	10 000-násobná	0,1	0,1
K_2HPO_4	1840	10 000-násobná	0,1	0,1
zásobný roztok s obsahom viacerých vitamínov	—	10 000-násobná	0,1	0,1

zásobný roztok s obsahom viacerých vitamínov sa pripraví pridaním 3 vitamínov do 1 litra vody týmto spôsobom:

	mg/l			
hydrochlorid tiamínu	750	10 000-násobná		
kyanokobalamín (B12)	10	10 000-násobná		
biotín	7,5	10 000-násobná		

Zásobný roztok s obsahom viacerých vitamínov sa skladuje zmrazený v malých alikvótnych množstvách. Vitamíny sa pridávajú do média tesne pred použitím.*Poznámka:*
Zrážaniu solí pri príprave kompletného média sa zabráni pridaním alikvotných množstiev zásobných roztokov do približne 500 až 800 ml deionizovanej vody a potom sa objem doplní na 1 liter.*Doplňujúca poznámka:*
Prvýkrát boli informácie o médiu M4 uverejnené v publikácii Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M7

Dodatok 3

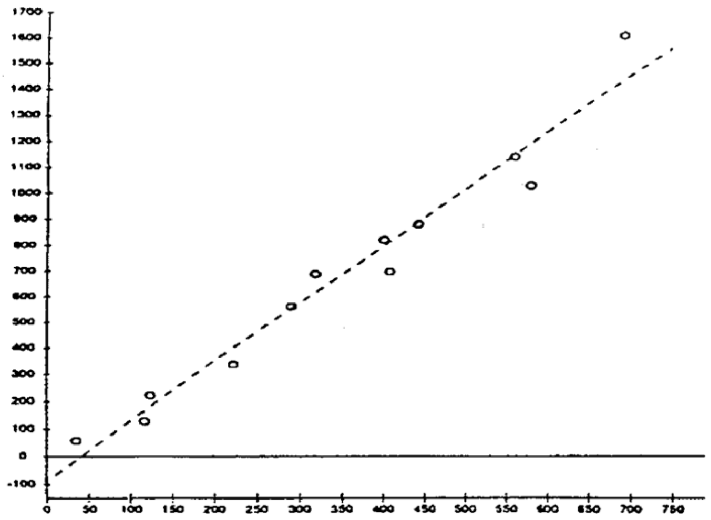
ANALÝZA OBSAHU CELKOVÉHO ORGANICKÉHO UHLÍKA (TOC) A PRÍPRAVA NOMOGRAMU NA ZISTENIE OBSAHU TOC V KRMIVE S OBSAHOM RIAS

Akceptuje sa skutočnosť, že obsah uhlíka v krmive s obsahom rias sa spravidla nemeria priamo, ale na základe korelácií (t. j. nomogramov) s náhradnými meraniami, akými je napr. počet buniek rias alebo absorpcia svetla).

TOC by sa mal merať na základe oxidácie pri vysokej teplote, a nie na základe metód oxidácie pomocou UV ožarovania alebo persíranu. (Informácie možno nájsť tu: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Na účely nomogramu by sa mali riasy odstredením v centrifúge oddeliť od rastového média a následne resuspendovať v destilovanej vode. Trikrát odmerajte náhradný parameter a koncentráciu TOC v každej vzorke. Mali by sa analyzovať slepé vzorky s destilovanou vodou a od koncentrácie s obsahom TOC vo vzorke rias by sa mala odpočítať koncentrácia TOC.

Nomogramy by mali mať lineárny charakter v rámci požadovaného rozsahu koncentrácií uhlíka. Ďalej uvádzame príklady.*Poznámka:*
nomogramy by sa nemali používať na účely konverzie; je nevyhnutné, aby si laboratóriá pripravili vlastné nomogramy.



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

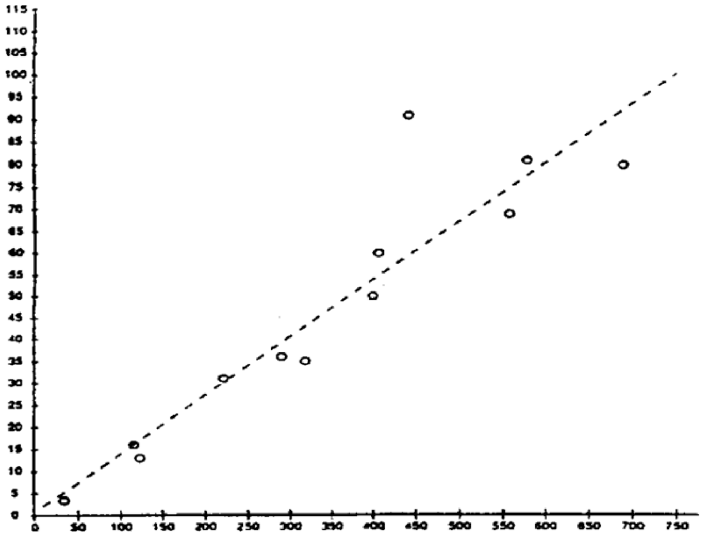
Regresia mg/l suchej hmotnosti na mg C/1. Údaje získané z koncentrovaných suspenzií buniek získaných v rámci polokontinuálnej produkcie jednorazovej kultúry rias a podrobených resuspenzácii v destilovanej vode.

os x: mg C/1 koncentrovaného krmiva s obsahom rias

os y: mg/1 suchej hmotnosti koncentrovaného krmiva s obsahom rias

Korekčný koeficient – 0,980

▼**M7**



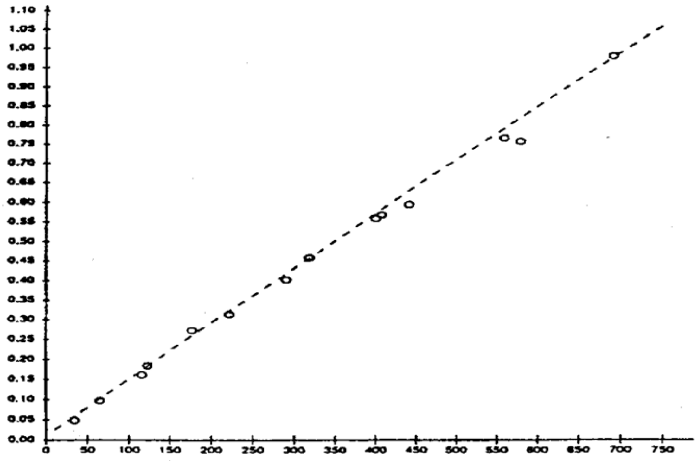
Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Regresia počtu buniek na mg C/1. Údaje získané z koncentrovaných suspenzií buniek získaných v rámci semikontinuálnej produkcie jednorazovej kultúry rias a podrobených resuspenzácii v destilovanej vode.

os x: mg C/1 koncentrovaného krmiva s obsahom rias

os y: Počet buniek/1 koncentrovaného krmiva s obsahom rias

Korekčný koeficient – 0,926



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Regresia absorpcie na mg C/1 (1 cm kyveta). Údaje získané z koncentrovaných suspenzií buniek získaných v rámci semikontinuálnej produkcie jednorazovej kultúry rias a podrobených resuspenzácii v destilovanej vode.

os x: mg C/1 koncentrovaného krmiva s obsahom rias

os y: Absorpcia pri 440 nm a riedení koncentrovaného krmiva s obsahom rias v pomere 1/10

Korekčný koeficient – 0,998

▼M7

Dodatok 4

VZOR TABUĽKY NA ZAZNAMENANIE OBNOVY MÉDIA, ÚDAJOV O FYZIKÁLNOM A CHEMICKOM MONITOROVANÍ, KŔMENÍ, REPRODUKCII DAFNIÍ A ÚMRTNOSTI RODIČOVSKÝCH JEDINCOV

Experiment č.:	Dátum začiatku:						Klon:			Médium:				Druh potravy:				Testovaná chemikália:					Nominálna koncentrácia:	
Deň	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
obnova média (označte)																								
pH (*)																							nová	
																							stará	
O_2 (mg/l) (*)																							nová	
																							stará	
teplota (°C) (*)																							nová	
																							stará	
podaná potrava (označte)																								
počet živých potomkov (**)																								spolu
nádoba 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

02008R0440 — SK — 16.10.2019 — 008.001 — 1825

▼M7

Experiment č.:	Dátum začiatku:						Klon:			Médium:				Druh potravy:				Testovaná chemikália:					Nominálna koncentrácia:	
Deň	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																								
																							spolu	
kumulatívna rodičovská úmrtnosť (***)																								

(*) Označte, ktorá nádoba sa použila na experiment
(**) Do príslušnej kolónky zaznamenajte pod značkou „AB“ počet nevyliahnutých vajíčok
(***) Do príslušnej kolónky zaznamenajte pod značkou „M“ úmrtnosť všetkých rodičovských jedincov

▼**M7**

Dodatok 5

VZOR TABUĽKY NA ZAZNAMENANIE VÝSLEDKOV CHEMICKEJ ANALÝZY

a) **Merané koncentrácie**

Nominálna koncentrácia:	Vzorka z týždňa 1		Vzorka z týždňa 2		Vzorka z týždňa 3	
	čerstvá	stará	čerstvá	stará	čerstvá	stará

b) **Merané koncentrácie ako percentuálny podiel nominálnej hodnoty**

Nominálna koncentrácia:	Vzorka z týždňa 1		Vzorka z týždňa 2		Vzorka z týždňa 3	
	čerstvá	stará	čerstvá	stará	čerstvá	stará

▼M7

Dodatok 6

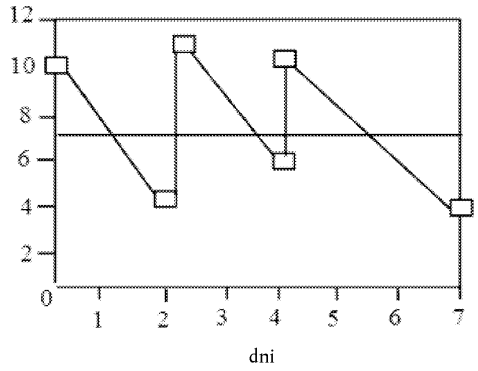
VÝPOČET ČASOVO VÁŽENÉHO PRIEMERU

Časovo vážený priemer

Keďže koncentrácia testovanej chemikálie môže v období medzi obnovami média poklesnúť, je potrebné zvážiť, ktorá koncentrácia by sa mala zvoliť ako reprezentatívna koncentrácia v rámci škály koncentrácií, v ktorých mali možnosť rodičovské dafnie existovať. Tento výber by mal vychádzať z biologických, ako aj štatistických úvah. Ak sa napríklad predpokladá, že na reprodukciu má vplyv najmä najvyššia zistená koncentrácia, potom by sa mala použiť maximálna koncentrácia. Ak sa však za dôležitejší považuje akumulovaný alebo dlhšie trvajúci účinok toxickej látky, vhodnejšie je použiť priemernú koncentráciu. V tomto prípade je uplatniteľným náležitým priemerom časovo vážená priemerná koncentrácia, pretože sa v nej zohľadňujú zmeny v okamžitej koncentrácií v priebehu času.

Obrázok 1

Príklad časovo váženého priemeru



Obrázok 1 znázorňuje príklad (zjednodušeného) testu trvajúceho sedem dní s obnovou média v dňoch 0, 2 a 4.

— Tenká kľukatá línia predstavuje koncentráciu v akomkoľvek časovom bode. Predpokladá sa, že po exponenciálnom rozkladnom procese nasleduje pokles koncentrácie.

— 6 znázornených bodov predstavuje pozorované koncentrácie merané na začiatku a na konci každého obdobia obnovy média.

— Hrubá pevná čiara indikuje pozíciu časovo váženého priemeru.

Časovo vážený priemer sa vypočíta tak, že plocha pod časovo váženým priemerom sa rovná ploche pod krivkou koncentrácie. Výpočet týkajúci sa spomínaného príkladu sa uvádza v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Výpočet časovo váženého priemeru

Č. obnovy	Dni	Koncentrácia 0	Koncentrácia 1	Ln (koncentrácia 0)	Ln (koncentrácia 1)	Plocha
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

Č. obnovy	Dni	Koncentrácia 0	Koncentrácia 1	Ln (koncentrácia 0)	Ln (koncentrácia 1)	Plocha
celkový počet dní:	7				celková plocha:	50,092
					časovo vážený priemer:	7,156

Dni je počet dní v období obnovy média

Koncentrácia 0 je nameraná koncentrácia na začiatku každého obdobia obnovy média

Koncentrácia 1 je nameraná koncentrácia na konci každého obdobia obnovy média

Ln (konc.0) je prirodzený logaritmus koncentrácie 0

Ln (konc.1) je prirodzený logaritmus koncentrácie 1

Plocha, je plocha pod exponenciálnou krivkou pre každé obdobie obnovy média. Vypočíta sa takto:

$$plocha = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times deň$$

Časovo vážený priemer *(TW Mean)* je *celková plocha* vydelená *celkovým počtom dní*.

V prípade reprodukčného testu týkajúceho sa dafnií by sa daná tabuľka mala, samozrejme, rozšíriť tak, aby pokryla 21 dní.

Je zrejmé, že pokiaľ sa pozorovania uskutočňujú iba na začiatku a konci každého obdobia obnovy média, nie je možné potvrdiť, že daný rozkladný proces má v skutočnosti exponenciálny charakter. Iná krivka by mala za následok iný výpočet *plochy*. Exponenciálny rozkladný proces však nie je nepravdepodobný a v prípade nedostatku ďalších informácií ide pravdepodobne o najvhodnejšiu krivku.

Ak sa na konci obdobia obnovy média chemickou analýzou nepodarí zistiť žiadnu chemikáliu, je potrebné na to upozorniť. Ak nemožno odhadnúť, ako rýchlo sa chemikália stratila z roztoku, je nemožné získať realistickú plochu pod krivkou, a teda nemožno dospieť k primeranej časovo váženému priemeru.

▼M7

Dodatok 7

USMERNENIA TYKAJÚCE SA URČENIA POHLAVIA NOVONARODENÝCH JEDINCOV

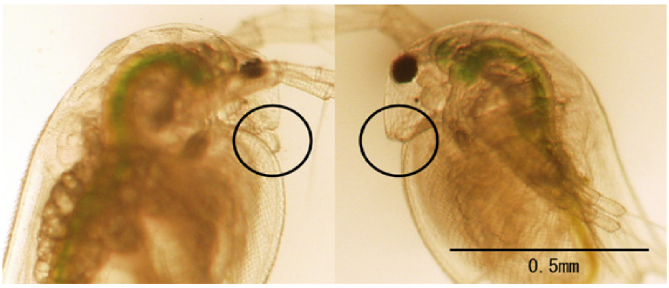
K narodeniu novonarodených jedincov mužského pohlavia môže dôjsť aj v premenlivých environmentálnych podmienkach, akými sú napríklad skrátená fotoperióda, teplota, pokles koncentrácie krmiva a zvýšenie hustoty populácie (Hobaek and Larson, 1990; Kleiven *et al*., 1992). Produkcia jedincov mužského pohlavia je aj známou odozvou na niektoré regulátory rastu hmyzu (Oda *et al*., 2005). Zvýšený počet jedincov mužského pohlavia by sa mohol očakávať za podmienok, keď chemické stresové faktory vyvolávajú pokles reprodukčného výstupu u partenogenetických samíc (OECD, 2008). Na základe dostupných informácií nemožno predpovedať, ktorý pomer pohlaví alebo pomer sledovaných parametrov týkajúcich sa reprodukcie bude citlivejší. Existujú však náznaky (odkaz na „validačnú správu“, časť 1), že tento zvýšený počet jedincov mužského pohlavia by mohol byť menej citlivý faktor ako pokles počtu potomkov. Keďže hlavným účelom tejto testovacej metódy je posúdiť počet vyprodukovaných potomkov, sledovanie výskytu jedincov mužského pohlavia nie je povinné. Ak sa tento nepovinný sledovaný parameter vyhodnotí v štúdii, potom by sa malo uplatniť dodatočné testovacie validačné kritérium, teda parameter maximálne 5 % jedincov mužského pohlavia pri kontrolných koncentráciách.

Najpraktickejší a najjednoduchším spôsobom rozlišovania pohlaví u dafnií je použiť ich fenotypové charakteristiky, keďže samce a samice sú z genetického hľadiska identické a ich pohlavie je environmentálne podmienené. Samce a samice majú rozdielnu dĺžku a tvar tykadiel prvého páru, ktoré majú samce dlhšie ako samice (obr. 1). Tento rozdiel sa dá rozpoznať ihneď po narodení, hoci vekom pribúdajú ďalšie sekundárne pohlavné znaky (pozri napr. obr. 2 v publikácii Olmstead and LeBlanc, 2000).

Na účely morfologického určenia pohlavia treba novonarodené jedince vyprodukované každým testovaným živočíchom preniesť pomocou pipety do Petriho misky s testovacím médiom. Médium je v záujme obmedzenia pohybu živočíchov obmedzené na minimum. Pod stereomikroskopom možno uskutočniť pozorovanie tykadiel prvého páru (× 10 – 60).

Obr. 1

24 hodín starý samec (vľavo) a samica (vpravo) *D. magna*. Ako je znázornené na obrázku (v krúžkoch), samce možno od samíc rozlíšiť podľa dĺžky a tvaru tykadiel prvého páru (Tatarazako *et al*., 2004).



ODKAZY

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. PÔDNE MIKROORGANIZMY: TEST TRANSFORMÁCIE DUSÍKA

1. METÓDA

Táto metóda zodpovedá OECD TG 216 (2000).

1.1. ÚVOD

Táto testovacia metóda opisuje laboratórnu metódu, určenú na stanovenie dlhodobých účinkov chemikálií po jednorazovej expozícii na aktivitu pôdnych mikroorganizmov transformovať dusík. Test sa v podstate zakladá odporúčaniach Organizácie na ochranu rastlín v Európe a stredomorskej oblasti (1). Zohľadnili sa však aj ďalšie usmernenia vrátane German Biologische Bundesanstalt (2), US Environmental Protection Agency (3), SETAC (4) a Medzinárodnej organizácie pre normalizáciu (5). Na OECD workshope o výbere pôd/sedimentov, ktorý sa konal v Belgirate, Taliansko, v roku 1995 (6) sa dohodlo množstvo a typy pôd používaných v tomto teste. Odporúčania pre odoberanie, manipuláciu a skladovanie vzoriek pôdy sa zakladajú na Usmerňovačom dokumente ISO (7) a odporúčaniach z workshopu v Belgirate. Pri posudzovaní a hodnotení toxických vlastností testovaných látok sa môže vyžadovať stanovenie účinkov na mikrobiálnu aktivitu pôdy, napr. keď sa vyžadujú údaje o potenciálnych vedľajších účinkoch výrobkov na ochranu rastlín na pôdnu mikroflóru, alebo keď sa predpokladá expozícia pôdnych mikroorganizmov inými chemikáliami, ako sú výrobky na ochranu rastlín. Test transformácie dusíka sa vykonáva na stanovenie účinkov takýchto chemikálií na pôdnu mikroflóru. Ak sa testujú agrochemikálie (napr. výrobky na ochranu rastlín, hnojivá, chemikálie používané v lesníctve) vykonáva sa test transformácie dusíka a aj test transformácie uhlíka. Ak sa testujú iné látky ako agrochemikálie, test transformácie dusíka je postačujúci. Ak však hodnoty EC_{50} testu transformácie dusíka pre takéto chemikálie ležia v rozsahu zistenom pre komerčne dostupné inhibitory nitrifikácie (napr. nitrapyrín), môže sa vykonať test transformácie uhlíka, aby sa získali ďalšie informácie.

Pôdy pozostávajú zo živých a neživých zložiek, ktoré existujú v komplexných a heterogénnych zmesiach. Mikroorganizmy zohrávajú významnú úlohu pri rozkladaní a transformácii organických látok v úrodných pôdach, pričom mnohé druhy prispievajú k rôznym aspektom úrodnosti pôdy. Každý dlhodobý vplyv na tieto biochemické procesy by mohol potenciálne narušiť obeh živín a toto by mohlo ovplyvniť úrodnosť pôdy. Transformácia uhlíka a dusíka sa vyskytuje vo všetkých úrodných pôdach. Aj keď sa mikrobiálne populácie, ktoré sú zodpovedné za tieto procesy, odlišujú v prípade jednotlivých pôd, cesty transformácie sú v podstate rovnaké.

Táto opísaná testovacia metóda je určená na stanovenie dlhodobých nepriaznivých účinkov látky na proces transformácie dusíka v aeróbnych povrchových pôdach. Testovacia metóda umožňuje aj stanovenie účinkov látky na transformáciu uhlíka v pôdnej mikroflóre. Tvorba dusíka sa uskutočňuje následne po degradácii väzieb medzi uhlíkom a dusíkom. Preto, ak sa rovnaké miery produkcie dusíka zistia v ošetrenej a kontrolnej pôde, je veľmi pravdepodobné, že hlavné cesty degradácie sú neporušené a funkčné. Substrát vybratý na test (prášková múka z lucerny) má vhodný pomer uhlíka a dusíka (zvyčajne medzi 12/1 a 16/1). Na základe tohto sa deficit uhlíka počas testu zníži a ak sú mikrobiálne populácie poškodené chemikáliou, môžu sa v priebehu 100 dní zotaviť.

▼B

Testy, z ktorých sa táto testovacia metóda vyvinula, boli prednostne určené pre látky, pri ktorých sa dá predpokladať množstvo, ktoré sa dostane do pôdy. Toto je prípad, napríklad výrobkov na ochranu rastlín, pri ktorých je známa aplikačná dávka v teréne. V prípade agrochemikálií postačuje testovanie dvoch dávok, ktoré zodpovedajú predpokladanej alebo predpovedanej aplikačnej dávke. Agrochemikálie sa môžu testovať ako aktívne zložky (a.z.) alebo ako zložené výrobky. Test sa však neobmedzuje na agrochemikálie. Zmenením množstva testovanej látky aplikovanej na pôdu a aj spôsobu, akým sa údaje vyhodnocujú, sa môže test použiť aj na chemikálie, v prípade ktorých nie je známe predpokladané množstvo, ktoré sa dostane do pôdy. A takto sa pre iné chemikálie ako agrochemikálie stanovia účinky série koncentrácií na transformáciu dusíka. Údaje z týchto testov sa použijú na prípravu krivky reakcie na dávku a vypočítajú sa hodnoty EC_x, kde x je definovaný účinok v percentuálnom vyjadrení.

1.2. DEFINÍCIE

Transformácia dusíka: konečná degradácia organickej látky, ktorá obsahuje dusík, mikroorganizmami prostredníctvom procesu amonifikácie a nitrifikácie na príslušný anorganický konečný produkt nitrát.

EC_x (Efektívna koncentrácia): je koncentrácia testovanej látky v pôde, ktorá spôsobí x percentnú inhibíciu transformácie dusíka na nitrát.

EC_{50} (Stredná efektívna koncentrácia): je koncentrácia testovanej látky v pôde, ktorá spôsobí 50 percentnú (50 %) inhibíciu transformácie dusíka na nitrát.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Preosiata pôda sa doplní s práškovou rastlinnou múkou a buď sa ošetrí testovanou látkou, alebo sa ponechá bez ošetrenia (kontrola). Ak sa testujú agrochemikálie, odporúčajú sa minimálne dve testované koncentrácie a tieto koncentrácie sa vyberú vzhľadom na najvyššiu koncentráciu predpokladanú v teréne. Po 0, 7, 14 dňoch a 28 dňoch inkubácie sa vzorky ošetrených a kontrolných pôd extrahujú vo vhodnom rozpúšťadle a stanovia sa množstvá nitrátu v extraktoch. Miera tvorby nitrátu v ošetrených vzorkách sa porovná s mierou v kontrolách a vypočíta sa percentuálna odchýlka ošetrenej vzorky od kontroly. Všetky testy prebiehajú aspoň 28 dní. Ak sú na 28. deň rozdiely medzi ošetrenými a neošetrenými pôdami rovnaké alebo väčšie ako 25 %, merania pokračujú do maximálne 100 dní. Ak sa testujú iné látky ako agrochemikálie, testovaná látka sa pridá v sérii koncentrácií do vzoriek pôdy a zmerajú sa množstvá nitrátu, ktorý sa vytvorí v ošetrených a kontrolných vzorkách po 28 dňoch inkubácie. Výsledky z testov s viacerými rozdielnymi koncentráciami sa analyzujú s použitím regresného modelu a vypočítajú sa hodnoty EC_X (t. j. EC_{50}, EC_{25} a/alebo EC_{10}). Pozri definície.

1.5. VALIDITA TESTU

Hodnotenia výsledkov testu s agrochemikáliami sa zakladajú na relatívne malých rozdieloch (t. j. priemerná hodnota ± 25 %) medzi koncentráciami nitrátu v kontrolných a ošetrených vzorkách pôdy, takže veľké odchýlky v kontrolách môžu viesť k nesprávnym výsledkom. Z tohto dôvodu odchýlka medzi paralelnými kontrolnými vzorkami má byť menšia ako ±15 %.

▼B

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. **Aparatúra**

Používajú sa testovacie nádoby, vyrobené z chemicky inertného materiálu. Mali by mať vhodný objem v súlade s postupom, použitým na inkubáciu pôd, t. j. hromadná inkubácia alebo séria jednotlivých vzoriek pôdy (pozri oddiel 1.7.1.2). Je potrebné venovať pozornosť minimalizovaniu strát vody, a aj tomu, aby sa počas testu umožnila výmena plynov (napr. testovacie nádoby sa môžu zakryť perforovanou polyetylénovou fóliou). Keď sa testujú prchavé látky, použijú sa nádoby, ktoré sa dajú utesniť a plynotesné nádoby. Tieto majú mať takú veľkosť, aby mohli byť asi do jednej štvrtiny svojho objemu vyplnené vzorkou pôdy.

Používa sa bežné laboratórne zariadenie vrátane:

— miešacieho zariadenia: mechanická miešačka alebo rovnocenné zariadenie,

— odstredivky (3 000 g) alebo filtračného zariadenia (s beznitrátovým filtračným papierom),

— prístroj s vhodnou citlivosťou reprodukovateľnosťou na analýzu nitrátu.

1.6.2. **Výber a počet pôd**

Použije sa jediná pôda. Odporúčané charakteristiky pôdy sú tieto:

— obsah piesku: nie menej ako 50 % a nie viac ako 75 %,

— pH: 5,5 – 7,5,

— obsah organického uhlíka: 0,5 – 1,5 %,

— stanoví sa mikrobiálna biomasa (8), (9) a obsah uhlíka v nej má byť aspoň 1 % celkového organického uhlíka v pôde.

Vo väčšine prípadov pôda s týmito charakteristikami predstavuje najhorší prípad, ktorý môže nastať, pretože adsorpcia testovanej chemikálie je minimálna a jej dostupnosť pre mikroflóru je maximálna. Následne nie sú vo všeobecnosti potrebné testy s inými pôdami. Za určitých okolností však, t. j. ak sa predpokladá hlavné použitie testovanej látky v konkrétnych pôdach, ako sú kyslé lesné pôdy, alebo v prípade elektrostaticky nabitých chemikálií, môže byť potrebné použiť ďalšiu pôdu.

▼B

1.6.3. **Odber a skladovanie vzoriek pôdy**

1.6.3.1. *Odber*

Potrebné sú podrobné informácie o histórii miesta v teréne, odkiaľ sa testovaná pôda odobrala. Uvádza sa presná poloha, porast, dátumy ošetrení výrobkami na ochranu rastlín, ošetrenia organickými a anorganickými hnojivami, prídavky biologických materiálov alebo náhodné kontaminácie. Miesto, vybraté na odber pôdy, má byť také, aby umožňovalo dlhodobé použitie. Stále pasienky, polia s ročnými plodinami (okrem kukurice) alebo husto zasiate rastliny na zelené hnojivo sú vhodné. Vybraté miesto na odber sa nesmie ošetrovať výrobkami na ochranu rastlín minimálne jeden rok pred odberom. Aspoň šesť mesiacov sa nesmie použiť ani žiadne organické hnojivo. Použitie minerálneho hnojiva je prijateľné iba v prípade, ak sa v súlade s požiadavkami na vzorky plodín a vzoriek pôdy neodoberú skôr ako minimálne tri mesiace po aplikácii hnojiva. Je potrebné vyhnúť sa použitiu pôdy ošetrenej hnojivami so známymi biocídnymi účinkami (napr. kyanamid vápenatý).

Vzorky by sa nemali odoberať počas alebo bezprostredne po dlhých obdobiach (viac ako 30 dní) sucha alebo nadmernej vlahy. Vzorky ornej pôdy odoberajú z hĺbky 0 až 20 cm. Pre vzorky pôdy z pastvín (lúk) alebo iných pôd, ktoré sa dlhšiu dobu neorú (aspoň jedno vegetačné obdobie), môže byť maximálna hĺbka odberu vzoriek o niečo väčšia ako 20 cm (napr. 25 cm).

Vzorky pôdy sa prepravujú v nádobách a za teplotných podmienok, ktoré zaručujú, že sa pôvodné vlastnosti pôdy významne nezmenia.

1.6.3.2. *Uchovávanie*

Uprednostňuje sa použitie čerstvo odobratých pôd z terénu. Ak nie je možné vyhnúť sa skladovaniu v laboratóriu, pôdy sa môžu skladovať v tme pri 4 ± 2 °C najviac tri mesiace. Počas uchovávania vzoriek sa musia zabezpečiť aeróbne podmienky. Ak sa pôdy odoberajú z oblastí, kde sú zamrznuté aspoň tri mesiace do roka, môže sa uvažovať o skladovaní šesť mesiacov pri mínus 18 °C až mínus 22 °C. Pred každým pokusom sa stanoví mikrobiálna biomasa skladovaných pôd a uhlík v biomase by mal tvoriť aspoň 1 % z celkového obsahu organického uhlíka v pôde (pozri oddiel 1.6.2).

1.6.4. **Manipulácia a príprava pôdy na test**

1.6.4.1. *Preinkubácia*

Ak sa pôda skladuje (pozri oddiel 1.6.3.2), odporúča sa preinkubácia v trvaní medzi 2 a 28 dňami. Teplota a obsah vlhkosti pôdy počas preinkubácie by mali byť rovnaké, ako sú tie, ktoré sa použijú v teste (pozri oddiely 1.6.4.2 a 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2. *Fyzikálno-chemické charakteristiky*

Pôda sa ručne zbaví veľkých predmetov (napr. kameňov, častí rastlín atď.) a potom sa vlhká preoseje tak, aby sa príliš nevysušila, na veľkosť častíc menšiu alebo rovnajúcu sa 2 mm. Obsah vlhkosti vzorky pôdy sa nastaví destilovanou alebo deionizovanou vodou na hodnotu medzi 40 % a 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody.

1.6.4.3. *Obohatenie organickým substrátom*

Pôda sa obohatí vhodným organickým substrátom, napr. práškovou múkou z lucerny-trávy-zeleného krmiva (hlavná zložka: *Medicago sativa*) s pomerom C/N medzi 12/1 a 16/1. Odporúčaný pomer lucerna – pôda je 5 g lucerny na kilogram pôdy (suchá hmotnosť).

1.6.5. **Príprava testovanej látky na aplikáciu do pôdy**

Testovaná látka sa zvyčajne aplikuje s použitím nosiča. Nosičom môže byť voda (pre látky rozpustné vo vode) alebo inertná tuhá látka ako napr. jemný kremenný piesok (veľkosť častíc: 0,1 – 0,5 mm). Kvapalné nosiče, ktoré sú iné ako voda (napr. organické rozpúšťadlá ako acetón, chloroform), by sa nemali používať, lebo môžu poškodzovať mikroflóru. Ak sa ako nosič použije piesok, môže byť pokrytý testovanou látkou, ktorá je rozpustená alebo suspendovaná vo vhodnom rozpúšťadle. V takýchto prípadoch sa rozpúšťadlo pred zmiešaním s pôdou odparí. Pre optimálnu distribúciu testovanej látky v pôde sa odporúča pomer 10 g piesku na kilogram pôdy (suchá hmotnosť). Kontrolné vzorky sa ošetria iba rovnakým množstvom vody a/alebo kremenného piesku.

Pri testovaní prchavých chemikálií je potrebné pokiaľ možno zabrániť stratám počas ošetrenia a pokúsiť sa o zabezpečenie homogénnej distribúcie v pôde (napr. testovaná látka sa na niekoľkých miestach vstrekne do pôdy).

1.6.6. **Testované koncentrácie**

Pri testovaní agrochemikálií by sa mali použiť aspoň dve koncentrácie. Nižšia koncentrácia by mala zohľadňovať prinajmenšom očakávané maximálne množstvo, ktoré sa dostane do pôdy za zvyčajných okolností v praxi, pričom vyššia koncentrácia by mala byť násobkom nižšej koncentrácie. Koncentrácie testovanej látky, pridanej do pôdy, sa vypočítajú za predpokladu jednotného zabudovania do hĺbky 5 cm a objemovej hmotnosti pôdy 1,5. V prípade agrochemikálií, ktoré sa aplikujú priamo do pôdy, alebo v prípade chemikálií, pre ktoré sa dá predpovedať množstvo, ktoré sa dostatne do pôdy, odporúčané testované koncentrácie sú maximálne predpovedané environmentálne koncentrácie [Predicted Environmental Concentration (PEC)] a päťnásobok týchto koncentrácií. Látky, pri ktorých sa očakáva, že sa budú aplikovať do pôd niekoľkokrát za sezónu, sa testujú s koncentráciami, ktoré sa stanovia vynásobením PEC maximálnym predpokladaným počtom aplikácií. Horná testovaná koncentrácia by však nemala prekročiť desaťnásobok maximálnej jednorazovej aplikačnej dávky. Ak sa testujú iné látky ako agrochemikálie, použije sa geometrický rad s aspoň piatimi koncentráciami. Testované koncentrácie by mali byť v rozsahu potrebnom na stanovenie hodnôt EC_x.

▼B

1.7. VYKONANIE TESTU

1.7.1. **Podmienky expozície**

1.7.1.1. *Ošetrenie a kontrola*

Pri testovaní agrochemikálií sa pôda rozdelí do troch dávok s rovnakou hmotnosťou. Dve dávky sa zmiešajú s nosičom, ktorý obsahuje produkt, a ďalšia sa zmieša s nosičom bez produktu (kontrola). Odporúčajú sa minimálne tri paralelné vzorky pre ošetrené a aj neošetrené pôdy. Pri testovaní iných látok ako agrochemikálií sa pôda rozdelí do šiestich dávok s rovnakou hmotnosťou. Päť vzoriek sa zmieša s nosičom, ktorý obsahuje testovanú látku, a šiesta vzorka sa zmieša s nosičom bez chemikálie. Odporúčajú sa tri paralelné vzorky pre ošetrené a aj kontrolné vzorky. Je potrebné venovať pozornosť zabezpečeniu homogénnej distribúcie testovanej látky v ošetrených vzorkách pôdy. Počas zmiešavania je potrebné zabrániť, aby sa pôda ubila, alebo sa vytvorili hrudky.

1.7.1.2. *Inkubácia vzoriek pôdy*

Inkubácia vzoriek pôdy sa môže vykonať dvomi spôsobmi: ako hromadné vzorky každej ošetrenej a neošetrenej pôdy alebo série jednotlivých a rovnako veľkých čiastočných vzoriek každej ošetrenej a neošetrenej pôdy. Ak sa však testujú prchavé látky, test sa uskutoční len so sériou jednotlivých čiastočných vzoriek. Ak sa pôdy inkubujú hromadne, pripravujú sa veľké množstvá ošetrenej a neošetrenej pôdy a čiastočné vzorky, ktoré sa majú analyzovať, sa odoberú podľa potreby počas testu. Množstvo pripravené na začiatku pre každé ošetrenie a kontrolu závisí od veľkosti čiastočných vzoriek, počtu paralelných vzoriek použitých na analýzu a predpokladaného maximálneho počtu odberov vzoriek. Pôdy inkubované hromadne sa dôkladne premiešajú pred odberom čiastočných vzoriek. Ak sa pôdy inkubujú ako séria jednotlivých vzoriek pôdy, každá ošetrená a neošetrená hromadne inkubovaná pôda sa rozdelí do požadovaného počtu čiastočných vzoriek a tieto vzorky sa použijú podľa potreby. V pokusoch, pri ktorých sa predpokladajú viac ako dva odbery, sa pripraví dostatočný počet čiastočných vzoriek, aby sa zohľadnili všetky paralelné vzorky a odbery. Aspoň tri paralelné vzorky testovanej pôdy by sa mali inkubovať za aeróbnych podmienok. Počas všetkých testov by sa mali použiť vhodné nádoby s dostatočnou plynnou fázou, aby sa zabránilo vytvoreniu anaeróbnych podmienok. Ak sa testujú prchavé látky, test sa uskutoční len so sériou jednotlivých čiastočných vzoriek.

1.7.1.3. *Podmienky testu a trvanie*

Test sa uskutočňuje v tme pri teplote miestnosti 20 ± 2 °C. Obsah vlhkosti vzoriek pôdy by sa mal počas testu zachovať medzi 40 % a 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody v pôde (pozri oddiel 1.6.4.2) s rozpätím ± 5 %. Podľa potreby sa môže pridať destilovaná, deionizovaná voda.

Minimálne trvanie testu je 28 dní. Pri testovaní agrochemikálií sa porovnáva miera tvorby nitrátu v ošetrených a kontrolných vzorkách. Ak sa odlišujú o viac ako 25 % na 28. deň, test pokračuje, pokiaľ sa nedosiahne rozdiel rovný alebo menší ako 25 %, alebo maximálne 100 dní, podľa toho, čo je kratšie. V prípade iných látok ako agrochemikálie sa test ukončí po 28 dňoch. Na 28. deň sa množstvá nitrátu v ošetrených a kontrolných vzorkách pôdy stanovia a vypočítajú sa hodnoty EC_x.

▼B

1.7.2. **Odber vzoriek a analýza pôd**

1.7.2.1. *Harmonogram odberu vzoriek*

Pri testovaní agrochemikálií sa vzorky pôdy analyzujú na nitrát v dni 0, 7, 14 a 28. Ak je potrebný predĺžený test, uskutočnia sa po 28. dni ďalšie merania v 14-denných intervaloch.

Ak sa testujú iné látky ako agrochemikálie použije sa aspoň päť testovaných koncentrácií a vzorky pôdy sa analyzujú na nitrát na začiatku (deň 0) a na konci expozície (28 dní). Ak sa to pokladá za potrebné, môže sa pridať napr. na siedmy deň prechodné meranie. Údaje získané na 28. deň sa použijú na stanovenie hodnoty EC_x pre chemikáliu. V prípade potreby sa môžu použiť v správe o počiatočnom množstve nitrátu v pôde údaje kontrolných vzoriek z dňa 0.

1.7.2.2. *Analýza vzoriek pôdy*

Množstvo nitrátu, ktoré sa vytvorí v každej ošetrenej a kontrolnej paralelnej vzorke, sa stanoví pri každom odbere. Nitrát sa extrahuje z pôdy pretrepávaním vzoriek s vhodným extrakčným činidlom, napr. 0,1 M roztokom chloridu draselného. Odporúča sa pomer 5 ml KCl na gram suchého hmotnostného ekvivalentu pôdy. Na optimalizáciu extrakcie by mali byť nádoby, v ktorých sa nachádza pôda a extrakčné činidlo, naplnené najviac do polovice. Zmesi sa pretrepávajú 60 minút pri 150 otáčkach za minútu (rpm). Zmesi sa odstreďujú alebo prefiltrujú a kvapalné fázy sa analyzujú na nitrát. Kvapalné extrakty, ktoré neobsahujú častice, sa môžu skladovať pred analýzou pri mínus 20 ± 5 °C do šiestich mesiacov.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Ak sa test uskutočňuje s agrochemikáliami, množstvo nitrátu, ktoré sa vytvorí v každej paralelnej vzorke pôdy, sa zaznamená a priemerné hodnoty všetkých paralelných vzoriek sa uvedú v podobe tabuliek. Miera transformácie dusíka sa vyhodnotí vhodnými a všeobecne uznávanými štatistickými metódami (napr. F-test, 5 % úroveň významnosti). Množstvá vytvoreného nitrátu v mg nitrátu/kg suchej hmotnosti pôdy/deň. Miera tvorby nitrátu v každej ošetrenej vzorke sa porovná s kontrolnou vzorkou a vypočíta sa percentuálna odchýlka od kontrolnej vzorky.

Ak sa test uskutočňuje s inými látkami ako agrochemikáliami, stanoví sa množstvo vytvoreného nitrátu v každej paralelnej vzorke a krivka reakcie na dávku na stanovenie hodnôt EC_x. Množstvá nitrátu (t. j. mg nitrátu/kg suchej hmotnosti pôdy) zistené v ošetrených vzorkách po 28 dňoch sa porovná s množstvami zistenými v kontrole. Z týchto údajov sa vypočítajú hodnoty inhibície v percentuálnom vyjadrení pre každú testovanú koncentráciu. Tieto percentuálne hodnoty sa vynesú proti koncentrácii a potom sa použijú štatistické postupy na výpočet hodnôt ECX. Hranice spoľahlivosti (p = 0,95) pre vypočítané EC_x sa tiež stanovia s použitím štandardných postupov (10), (11), (12).

Testované látky, ktoré obsahujú veľké množstvá dusíka, môžu prispieť k množstvám nitrátu vytvoreného počas testu. Ak sa tieto látky testujú pri vysokej koncentrácii (napr. chemikálie, pri ktorých sa predpokladá opakované používanie), musia sa zahrnúť do testu príslušné kontroly (t. j. pôda plus testovaná látka, ale bez rastlinnej múky). Údaje z týchto kontrol sa musia zohľadniť vo výpočtoch EC_x.

▼B

2.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Ak je pri hodnotení výsledkov z testov s agrochemikáliami rozdiel v miere tvorby nitrátu medzi nižším ošetrením (t. j. maximálna očakávaná koncentrácia) a kontrolou rovný alebo menší ako 25 % pri každom odbere vzoriek po dni 28, môže sa vyhodnotiť, že produkt nemá dlhodobý vplyv na transformáciu dusíka v pôdach. Pri hodnotení výsledkov testov s inými chemikáliami ako agrochemikáliami sa používajú hodnoty EC_{50}, EC_{25} a/alebo EC_{10}.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Úplnú identifikáciu použitej pôdy, vrátane:

— geografických údajov o mieste (zemepisná šírka, dĺžka),

— informácie o histórii miesta (t. j. rastlinný porast, ošetrenia s výrobkami na ochranu rastlín, ošetrenia s hnojivami, náhodná kontaminácia atď.),

— štruktúra využitia (napr. poľnohospodárska pôda, les atď.),

— hĺbka odberu vzoriek (cm),

— obsah piesku/bahna/ílu (% suchej hmotnosti),

— pH (vo vode),

— obsah organického uhlíka (% suchej hmotnosti),

— obsah dusíka (% suchej hmotnosti),

— počiatočná koncentrácia nitrátu (mg nitrátu/kg suchej hmotnosti),

— kapacita výmeny katiónov (mmol/kg),

— mikrobiálna biomasa v percentách celkového organického uhlíka,

— údaje o metódach použitých na stanovenie každého parametra,

— všetky informácie týkajúce sa odberu a skladovania vzoriek pôdy,

— údaje o prípadnej preinkubácii pôdy.

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

— chemické identifikačné údaje, v prípade potreby vrátane štruktúrneho vzorca, čistoty (t. j. v prípade výrobkov na ochranu rastlín percento účinnej látky), obsah dusíka.

Substrát:

— zdroj substrátu,

— zloženie (t. j. múka z lucerny, múka z lucerny – trávy – zeleného krmiva),

— obsah uhlíka, dusíka (% suchej hmotnosti),

— veľkosť otvorov sita (mm).

▼B

Testovacie podmienky:

— údaje o obohatení pôdy organickým substrátom,

— počet použitých koncentrácií testovanej chemikálie a v prípade potreby zdôvodnenie vybratých koncentrácií,

— údaje o aplikácii testovanej látky do pôdy,

— inkubačná teplota,

— obsah vlhkosti v pôde na začiatku a počas testu,

— použitá metóda inkubácie pôdy (t. j. hromadná alebo ako séria jednotlivých čiastkových vzoriek),

— počet paralelných vzoriek,

— počet odberov,

— metóda použitá na extrakciu nitrátu z pôdy.

Výsledky:

— analytický postup a zariadenie použité na analýzu nitrátu,

— údaje vo forme tabuliek, vrátane jednotlivých a priemerných hodnôt pri stanovení nitrátu,

— odchýlka medzi paralelnými a kontrolnými vzorkami,

— vysvetlenie prípadných korekcií pri výpočtoch,

— percentuálna odchýlka v mierach tvorby nitrátu pri každom odbere alebo v prípade potreby hodnota EC_{50} s 95 % hranicou spoľahlivosti, iné EC_x (t. j. EC_{25} alebo EC_{10}) s intervalmi spoľahlivosti a graf krivky reakcie na dávku,

— štatistické spracovanie výsledkov,

— všetky informácie a pozorovania umožňujúce interpretáciu výsledkov.

4. **ODKAZY**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1 – 16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bruxelles.

(5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality – Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: Soil Quality – Biological Methods.

▼B

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italie, 18 – 20 janvier 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, 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. PÔDNE MIKROORGANIZMY: TRANSFORMAČNÝ TEST UHLÍKA

1. METÓDA

Táto metóda zodpovedá OECD TG 217 (2000).

1.1. ÚVOD

Táto testovacia metóda opisuje laboratórnu metódu, určenú na skúmanie dlhodobých potenciálnych účinkov chemikálií jednorazovej expozície výrobkami na ochranu rastlín, a prípadne iných chemikálií, na aktivitu pôdnych mikroorganizmov transformovať uhlík. Test sa v podstate zakladá odporúčaniach Organizácie na ochranu rastlín v Európe a stredomorskej oblasti (1). Zohľadnili sa aj ďalšie usmernenia ako German Biologische Bundesanstalt (2), US Environmental Protection Agency (3) a SETAC (4). OECD workshop o výbere pôd/sedimentov, ktorý sa konal v Belgirate, Taliansko, v roku 1995 (5) sa dohodol na množstve a type pôd používaných v tomto teste. Odporúčania pre odoberanie, manipuláciu a skladovanie vzoriek pôdy sa zakladajú na Usmerňovacom dokumente ISO (6) a odporúčaniach z workshopu v Belgirate.

Pri posudzovaní a hodnotení toxických vlastností testovaných látok sa môže vyžadovať stanovenie účinkov na mikrobiálnu aktivitu pôdy, napr. keď sa vyžadujú údaje o potenciálnych vedľajších účinkoch výrobkov na ochranu rastlín na pôdnu mikroflóru, alebo ak sa predpokladá expozícia pôdnych mikroorganizmov iným chemikáliám, ako sú výrobky na ochranu rastlín. Test transformácie uhlíka sa vykonáva na stanovenie účinkov takýchto chemikálií na pôdnu mikroflóru. Ak sa testujú agrochemikálie (napr. výrobky na ochranu rastlín, hnojivá, chemikálie používané v lesnom hospodárstve) vykonáva sa test transformácie uhlíka a aj test transformácie dusíka. Ak sa testujú iné látky ako agrochemikálie, test transformácie dusíka je postačujúci. Ak však hodnoty EC_{50} testu transformácie dusíka pre takéto chemikálie sú v rozsahu zistenom pre komerčne dostupné inhibitory nitrifikácie (napr. nitrapyrín), na získanie ďalších informácií sa môže vykonať test transformácie uhlíka.

Pôdy pozostávajú zo živých a neživých zložiek, ktoré existujú v komplexných a heterogénnych zmesiach. Mikroorganizmy zohrávajú významnú úlohu pri rozkladaní a transformácii organických látok v úrodných pôdach, pričom mnohé druhy prispievajú k rôznym aspektom úrodnosti pôdy. Každý dlhodobý vplyv na tieto biochemické procesy by mohol potenciálne narušiť obeh živín a to by mohlo ovplyvniť úrodnosť pôdy. Transformácia uhlíka a dusíka sa vyskytuje vo všetkých úrodných pôdach. Aj keď sa mikrobiálne populácie, zodpovedné za tieto procesy, odlišujú v prípade jednotlivých pôd, cesty transformácie sú v podstate rovnaké.

▼B

Táto testovacia metóda je určená na stanovenie dlhodobých nepriaznivých účinkov látky na proces transformácie uhlíka v aeróbnych povrchových pôdach. Tento test je citlivý na zmeny veľkosti a aktivity mikrobiálnych populácií, zodpovedných za transformáciu uhlíka, keďže vystavuje tieto populácie pôsobeniu chemikálií a nedostatku uhlíka. Používa sa piesková pôda, chudobná na organické látky. Táto pôda sa ošetrí testovanou látkou a inkubuje za podmienok, ktoré umožňujú rýchly mikrobiálny metabolizmus. Za týchto podmienok sa zdroje ľahko dostupného uhlíka v pôde rýchlo spotrebujú. Toto spôsobí nedostatok uhlíka, ktoré zabíja mikrobiálne bunky a vyvoláva latentný stav a/alebo sporuláciu. Ak test prebieha viac ako 28 dní, súhrn týchto reakcií sa môže stanoviť v kontrolách (neošetrenej pôdy) ako progresívna strata metabolicky aktívnej biomasy (7). Ak na biomasu v pôde vystavenú nedostatku uhlíka, v podmienkach testu pôsobí prítomnosť chemikálie, nemusí sa vrátiť na rovnakú úroveň ako kontrola. A preto narušenie spôsobené testovanou látkou kedykoľvek počas testu bude často pretrvávať do konca testu.

Testy, z ktorých sa táto testovacia metóda vyvinula, boli prednostne určené pre látky, pri ktorých sa dá predpokladať množstvo, ktoré sa dostane do pôdy. Napríklad v prípade výrobkov na ochranu rastlín, pri ktorých je známa aplikačná dávka v teréne. V prípade agrochemikálií je testovanie dvoch dávok, ktoré zodpovedajú predpokladanej alebo predpovedanej aplikačnej dávke, dostačujúce. Agrochemikálie sa môžu testovať ako aktívne zložky (a.z.) ako zložené výrobky. Test však sa však obmedzuje na chemikálie s predvídateľnými environmentálnymi koncentráciami. Zmenením množstva testovanej látky aplikovanej na pôdu a spôsobu, akým sa údaje vyhodnocujú, sa test môže použiť aj na chemikálie, v prípade ktorých nie je známe predpokladané množstvo, ktoré sa dostane do pôdy. A tým sa pri iných chemikáliách ako agrochemikálie stanovia účinky série koncentrácií na transformáciu uhlíka. Údaje z týchto testov sa použijú na prípravu krivky vzťahu medzi dávkou a reakciou a vypočítajú sa hodnoty EC_x, kde x je definované ako účinok v percentuálnom vyjadrení.

1.2. DEFINÍCIE

Transformácia uhlíka: je degradácia organickej látky mikroorganizmami na anorganický konečný produkt oxid uhličitý.

EC_x (Efektívna koncentrácia): je koncentrácia testovanej látky v pôde, ktorá spôsobí x percentnú inhibíciu transformácie uhlíka na oxid uhličitý.

EC_{50} (Stredná efektívna koncentrácia): je koncentrácia testovanej látky v pôde, ktorá spôsobí 50 percentnú inhibíciu transformácie uhlíka na oxid uhličitý.

1.3. REFERENČNÉ LATKY

Žiadne.

▼B

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Preosiata pôda sa ošetrí testovanou látkou, alebo sa ponechá bez ošetrenia (kontrola). Ak sa testujú agrochemikálie, odporúčajú sa minimálne dve testované koncentrácie a tieto koncentrácie sa vyberú vo vzťahu k najvyššej koncentrácii predpokladanej v teréne. Po 0., 7., 14. a 28. dni inkubácie sa vzorky ošetrených a kontrolných pôd zmiešajú s glukózou a merajú sa glukózou indukované rýchlosti respirácie po sebe nasledujúcich 12 hodín. Rýchlosti respirácie sa vyjadrujú ako uvoľnený oxid uhličitý (mg oxidu uhličitého/kg suchej pôdy/h) alebo spotrebovaný kyslík (mg kyslíka/kg pôdy/h). Priemerná rýchlosť respirácie vo vzorkách s ošetrenou pôdou sa porovná s pôdou v kontrole a vypočíta sa percentuálna odchýlka ošetrenej pôdy od kontroly. Všetky testy prebiehajú aspoň 28 dní. Ak na 28. deň sa rozdiely medzi ošetrenými a neošetrenými pôdami rovnajú alebo sú väčšie ako 25 %, merania pokračujú v 14 dňových intervaloch do maximálne 100 dní. Ak sa testujú iné chemikálie ako agrochemikálie, pridáva sa séria koncentrácií testovanej látky ku vzorkám pôdy a glukózou indukované rýchlosti respirácie (t. j. priemer množstiev vzniknutého oxidu uhličitého alebo spotrebovaného kyslíka) sa stanovia po 28 hodinách. Výsledky z testov zo série koncentrácií sa analyzujú s použitím regresného modelu a vypočítajú sa hodnoty EC_x (t. j. EC_{50}, EC_{25} a/alebo EC_{10}). Pozri definície.

1.5. VALIDITA TESTU

Hodnotenia výsledkov testu s agrochemikáliami sa zakladajú na relatívne malých rozdieloch (t. j. priemerná hodnota ± 25 %) medzi uvoľneným oxidom uhličitým alebo spotrebovaným kyslíkom v (alebo prostredníctvom) kontrolných a ošetrených vzorkách pôdy, takže veľké odchýlky v kontrolách môžu viesť k nesprávnym výsledkom. Z tohto dôvodu odchýlka medzi paralelnými kontrolnými vzorkami má byť menšia ako ± 15 %.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. **Aparatúra**

Použijú sa testovacie nádoby, vyrobené z chemicky inertného materiálu. Mali by mať vhodný objem v súlade s postupom použitým na inkubáciu pôd, t. j. hromadná inkubácia alebo séria jednotlivých vzoriek pôdy (pozri oddiel 1.7.1.2). Je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa minimalizovali straty vody, a aj tomu, aby sa počas testu umožnila výmena plynov (napr. testovacie nádoby sa môžu zakryť perforovanou polyetylénovou fóliou). Keď sa testujú prchavé látky, použijú sa nádoby, ktoré je možné utesniť a plynotesné nádoby. Tieto nádoby by mali mať takú veľkosť, aby mohli byť asi do jednej štvrtiny svojho objemu vyplnené vzorkou pôdy.

Na stanovenie glukózou indukovanej respirácie sa vyžadujú inkubačné systémy a prístroje na meranie tvorby oxidu uhličitého alebo spotreby kyslíka. Príklady takýchto systémov a nástrojov sa nachádzajú v literatúre (8), (9), (10), (11).

1.6.2. **Výber a počet pôd**

Použije sa jediná pôda. Odporúčané charakteristiky pôdy sú tieto:

— obsah piesku: nie menej ako 50 % a nie viac ako 75 %;

▼B

— pH: 5,5 – 7,5;

— obsah organického uhlíka: 0,5 – 1,5 %;

— mikrobiálna biomasa sa zmeria (12), (13) a jej obsah uhlíka by mal byť aspoň 1 % celkového organického uhlíka v pôde.

Vo väčšine prípadov pôda s týmito charakteristikami predstavuje najhorší prípad, ktorý môže nastať, pretože adsorpcia testovanej chemikálie je minimálna a jej dostupnosť pre mikroflóru je maximálna. Následne nie sú vo všeobecnosti potrebné testy s inými pôdami. Za určitých okolností však, t. j. ak sa predpokladá hlavné použitie testovanej látky v konkrétnych pôdach, ako sú kyslé lesné pôdy, alebo v prípade elektrostaticky nabitých chemikálií, sa môže vyžadovať použitie ďalšej pôdy.

1.6.3. **Odber a skladovanie vzoriek pôdy**

1.6.3.1. *Odber*

K dispozícii by mali byť podrobné informácie o histórii miesta v teréne, odkiaľ sa testovaná pôda odobrala. Uvádza sa presná poloha, porast, dátumy ošetrení výrobkami na ochranu rastlín, ošetrenia organickými a anorganickými hnojivami, prídavky biologických materiálov alebo náhodné kontaminácie. Miesto, vybraté na odber pôdy, má byť také, aby umožňovalo dlhodobé použitie. Vhodné sú stále pasienky, polia s ročnými plodinami (okrem kukurice) alebo husto zasiate rastliny na zelené hnojivo. Vybraté miesto na odber sa nesmie ošetrovať výrobkami na ochranu rastlín minimálne jeden rok pred odberom. Aspoň šesť mesiacov sa nesmie použiť ani žiadne organické hnojivo. Použitie minerálneho hnojiva je prijateľné iba v prípade, ak je potrebné pre plodiny a vzorky pôdy sa neodoberú skôr ako aspoň tri mesiace po aplikácii hnojiva. Je potrebné vyhnúť sa použitiu pôdy ošetrenej hnojivami so známymi biocídnymi účinkami (napr. kyanamid vápenatý).

Vzorky sa neodoberajú počas dlhých období (viac ako 30 dní) sucha alebo nadmernej vlahy alebo bezprostredne po nich. Vzorky ornej pôdy odoberajú z hĺbky 0 až 20 cm. Pre vzorky pôdy z pastvín (lúk) alebo iných pôd, ktoré sa dlhšiu dobu neorú (aspoň jedno vegetačné obdobie), môže byť maximálna hĺbka odberu vzoriek o niečo väčšia ako 20 cm (napr. 25 cm). Vzorky pôdy sa prepravujú v nádobách a za teplotných podmienok, ktoré zaručujú, že sa pôvodné vlastnosti pôdy významne nezmenia.

1.6.3.2. *Uchovávanie*

Uprednostňuje sa použitie čerstvo odobratých pôd z terénu. Ak sa nedá zabrániť skladovaniu v laboratóriu, pôdy sa môžu skladovať v tme pri 4 ± 2 °C najviac tri mesiace. Počas uchovávania vzoriek sa musia zabezpečiť aeróbne podmienky. Ak sa pôdy odoberajú z oblastí, kde sú zamrznuté aspoň tri mesiace do roka, môže sa uvažovať o skladovaní šesť mesiacov pri mínus 18 °C. Pred každým pokusom sa stanoví mikrobiálna biomasa skladovaných pôd a uhlík v biomase má tvoriť aspoň 1 % celkového obsahu organického uhlíka v pôde (pozri oddiel 1.6.2).

▼B

1.6.4. **Manipulácia a príprava pôdy na test**

1.6.4.1. *Preinkubácia*

Ak sa pôda skladuje (pozri oddiely 1.6.4.2 a 1.7.1.3), odporúča sa preinkubácia v trvaní medzi 2 a 28 dňami. Teplota a obsah vlhkosti pôdy počas preinkubácie by mali byť rovnaké, ako sa použije v teste (pozri oddiely 1.6.4.2 a 1.7.1.3).

1.6.4.2. *Fyzikálno-chemické charakteristiky*

Pôda sa ručne zbaví veľkých predmetov (napr. kameňov, častí rastlín atď.) a potom sa vlhká preoseje tak, aby sa príliš vysušila, na veľkosť častíc menšiu alebo rovnajúcu sa 2 mm. Obsah vlhkosti vzorky pôdy sa nastaví destilovanou alebo deionizovanou vodou na hodnotu medzi 40 % a 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody.

1.6.5. **Príprava testovanej látky na aplikáciu do pôdy**

Testovaná látka sa zvyčajne aplikuje s použitím nosiča. Nosičom môže byť voda (pre látky rozpustné vo vode) alebo inertná tuhá látka ako napr. jemný kremenný piesok (veľkosť častíc: 0,1 – 0,5 mm). Kvapalné nosiče, ktoré sú iné ako voda (napr. organické rozpúšťadlá ako acetón, chloroform), by sa nemali používať, lebo môžu poškodzovať mikroflóru. Ak sa použije piesok ako nosič, môže byť pokrytý testovanou látkou rozpustenou alebo suspendovanou vo vhodnom rozpúšťadle. V takýchto prípadoch sa rozpúšťadlo pred zmiešaním s pôdou odparí. Pre optimálnu distribúciu testovanej látky v pôde sa odporúča pomer 10 g piesku na kilogram pôdy (suchá hmotnosť). Kontrolné vzorky sa ošetria iba rovnakým množstvom vody a/alebo kremenného piesku.

Pri testovaní prchavých chemikálií je potrebné zabrániť stratám počas ošetrenia a pokúsiť sa o zabezpečenie homogénnej distribúcie v pôde (napr. testovaná látka sa na niekoľkých miestach vstriekne do pôdy).

1.6.6. **Testované koncentrácie**

Ak sa testujú výrobky na ochranu rastlín alebo iné chemikálie s predvídateľnými environmentálnymi koncentráciami, použijú sa aspoň dve koncentrácie. Nižšia koncentrácia by mala zohľadňovať prinajmenšom očakávané maximálne množstvo, ktoré sa dostane do pôdy za zvyčajných okolností v praxi, pričom vyššia koncentrácia by mala byť násobkom nižšej koncentrácie. Koncentrácie testovanej látky pridanej do pôdy sa vypočítajú za predpokladu jednotného zabudovania do hĺbky 5 cm a objemovej hmotnosti pôdy 1,5. V prípade agrochemikálií, ktoré sa aplikujú priamo do pôdy, alebo v prípade chemikálií, pre ktoré sa dá predpovedať množstvo, ktoré sa dostane do pôdy, odporúčané testovacie koncentrácie sú maximálne predvídateľné environmentálne koncentrácie [Predictable Environmental Concentration (PEC)] a päťnásobok týchto koncentrácií. Látky, pri ktorých sa očakáva, že sa budú aplikovať do pôd niekoľkokrát za sezónu, sa testujú s koncentráciami, ktoré sa stanovia vynásobením PEC maximálnym predpokladaným počtom aplikácií. Horná testovaná koncentrácia by však nemala prekročiť desaťnásobok maximálnej jednorazovej aplikačnej dávky.

Ak sa testujú iné látky ako agrochemikálie, použije sa geometrický rad s aspoň piatimi koncentráciami. Odporúča sa, aby testované koncentrácie boli v rozsahu potrebnom na stanovenie hodnôt EC_x.

▼B

1.7. VYKONANIE TESTU

1.7.1. **Podmienky expozície**

1.7.1.1. *Ošetrenie a kontrola*

Pri testovaní agrochemikálií, sa pôda rozdelí do troch dávok s rovnakou hmotnosťou. Dve dávky sa zmiešajú s nosičom, ktorý obsahuje produkt a ďalšia sa zmieša s nosičom bez produktu (kontrola). Odporúčajú sa minimálne tri paralelné vzorky pre ošetrené a aj neošetrené pôdy. Pri testovaní iných látok ako agrochemikálií sa pôda rozdelí do šiestich dávok s rovnakou hmotnosťou. Päť vzoriek sa zmieša s nosičom obsahujúcim testovanú látku a šiesta vzorka sa zmieša s nosičom bez chemikálie. Odporúčajú sa tri paralelné vzorky pre ošetrené a aj kontrolné vzorky. Je potrebné venovať pozornosť zabezpečeniu homogénnej distribúcie testovanej látky v ošetrených vzorkách pôdy. Počas miešania je potrebné zabrániť, aby sa pôda ubila, alebo sa vytvorili hrudky.

1.7.1.2. *Inkubácia vzoriek pôdy*

Inkubácia vzoriek pôdy sa môže vykonať dvomi spôsobmi: ako hromadné vzorky každej ošetrenej a neošetrenej pôdy alebo série jednotlivých a rovnako veľkých čiastočných vzoriek každej ošetrenej a neošetrenej pôdy. Ak sa však testujú prchavé látky, test by sa mal uskutočniť len so sériou jednotlivých čiastočných vzoriek. Ak sa pôdy inkubujú hromadne, pripravujú sa veľké množstvá ošetrenej a neošetrenej pôdy a čiastočné vzorky, ktoré sa majú analyzovať, sa odoberú podľa potreby počas testu. Množstvo pripravené na začiatku pre každé ošetrenie a kontrolu závisí od veľkosti čiastočných vzoriek, počtu paralelných vzoriek použitých na analýzu a predpokladaného maximálneho počtu odberov vzoriek. Pôdy, inkubované hromadne, sa dôkladne premiešajú pred odberom čiastočných vzoriek. Ak sa pôdy inkubujú ako séria jednotlivých vzoriek pôdy, každá ošetrená a neošetrená hromadne inkubovaná pôda sa rozdelí do požadovaného počtu čiastočných vzoriek a tieto vzorky sa použijú podľa potreby. V experimentoch, pri ktorých sa predpokladá viac ako dva odbery, sa pripraví dostatočný počet čiastočných vzoriek, aby sa zohľadnili všetky paralelné vzorky a odbery. Odporúča sa, aby sa aspoň tri paralelné vzorky testovanej pôdy inkubovali za aeróbnych podmienok (pozri oddiel 1.7.1.1). Počas všetkých testov sa by sa mali použiť vhodné nádoby s dostatočnou plynnou fázou, aby sa zabránilo vytvoreniu anaeróbnych podmienok. Ak sa testujú prchavé látky, test sa by sa mal vykonať len so sériou jednotlivých čiastočných vzoriek.

1.7.1.3. *Podmienky testu a trvanie*

Test sa uskutočňuje v tme pri teplote miestnosti 20 ± 2 °C. Obsah vlhkosti vzoriek pôdy sa počas testu zachová medzi 40 % a 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody v pôde (pozri oddiel 1.6.4.2) s rozpätím ± 5 %. Podľa potreby sa môže pridať destilovaná, deionizovaná voda.

Minimálne trvanie testu je 28 dní. Pri testovaní agrochemikálií sa porovnajú množstvá uvoľneného oxidu uhličitého alebo spotrebovaného kyslíka v ošetrených a kontrolných vzorkách. Ak sa odlišujú o viac ako 25 % na 28. deň, test pokračuje, pokiaľ sa nedosiahne rozdiel, ktorý sa rovná alebo je menší ako 25 %, alebo maximálne 100 dní, podľa toho, čo je kratšie. Pri testovaní iných látok ako agrochemikálie sa test ukončí po 28 dňoch. Na 28. deň sa množstvá uvoľneného oxidu uhličitého alebo spotrebovaného kyslíka v ošetrených a kontrolných vzorkách pôdy stanovia a vypočítajú sa hodnoty EC_x.

▼B

1.7.2. **Odber vzoriek a analýza pôd**

1.7.2.1. *Harmonogram odberu vzoriek*

Pri testovaní agrochemikálií sa vzorky pôdy analyzujú na glukózou indukované rýchlosti respirácie v dni 0, 7, 14 a 28. Ak je potrebný predĺžený test, uskutočnia sa po 28. dni ďalšie merania v 14-denných intervaloch.

Ak sa testujú iné látky ako agrochemikálie, použije sa aspoň päť testovaných koncentrácií a vzorky pôdy sa analyzujú na glukózou indukovanú respiráciu na začiatku (deň 0) a na konci vymedzeného času expozície (28 dní). Ak sa to pokladá za potrebné, môže sa pridať napr. na 7. deň prechodné meranie. Údaje, získané na 28. deň, sa použijú na stanovenie hodnoty EC_x pre chemikáliu. Podľa potreby sa môžu použiť údaje kontrolných vzoriek z dňa 0 na odhad počiatočných množstiev metabolicky aktívnej biomasy v pôde (12).

1.7.2.2. *Meranie glukózou indukovaných rýchlostí respirácie*

Rýchlosť respirácie, indukovaná glukózou v každej ošetrenej a kontrolnej paralelnej vzorke, sa stanoví pri každom odbere. Vzorky pôdy sa zmiešajú s dostatočným množstvom glukózy, aby sa zistila okamžitá maximálna respiračná reakcia. Množstvo glukózy, potrebnej na zistenie maximálnej respiračnej reakcie z danej pôdy, sa môže stanoviť v predbežnom teste s použitím série koncentrácií glukózy (14). Pre pieskové pôdy s 0,5 – 1,5 % organického uhlíka, 2 000 mg až 4 000 mg glukózy na kg suchej hmotnosti pôdy je zvyčajne dostačujúce. Glukóza sa môže pomlieť na prášok s čistým kremenným pieskom (10 g piesku/kg suchej hmotnosti pôdy) a homogénne sa zmieša s pôdou.

Vzorky s pridanou glukózou sa inkubujú vo vhodnej aparatúre na stanovenie rýchlosti respirácie buď kontinuálne, každú hodinu, alebo každé dve hodiny (pozri oddiel 1.6.1) pri 20 ± 2 °C. Uvoľnený oxid uhličitý alebo spotrebovaný kyslík sa stanoví 12 po sebe nasledujúcich 12 hodín a merania sa začnú čo najskôr, t. j. do 1 až 2 hodín po pridaní glukózy. Celkové množstvá uvoľneného oxidu uhličitého alebo spotrebovaného kyslíka počas 12 hodín sa zmerajú a stanovia sa priemerné rýchlosti respirácie.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Ak sa testujú agrochemikálie, množstvo uvoľneného oxidu uhličitého alebo spotrebovaného kyslíka v každej paralelnej vzorke pôdy sa zaznamená a priemerné hodnoty všetkých paralelných vzoriek sa uvedú v podobe tabuliek. Výsledky sa vyhodnotia vhodnými a všeobecne uznávanými štatistickými metódami (napr. F-test, 5 % úroveň významnosti). Rýchlosti respirácie indukovanej glukózou sa vyjadrujú v mg oxidu uhličitého/kg suchej hmotnosti pôdy/h alebo mg kyslíka/suchú hmotnosť pôdy/h. Priemerná hodnota miery tvorby oxidu uhličitého alebo priemerná hodnota miery spotrebovaného kyslíka sa porovná s hodnotami v kontrole a vypočíta sa percentuálna odchýlka od kontroly.

▼B

Ak sa test uskutočňuje s inými látkami ako agrochemikáliami, stanovia sa množstvá uvoľneného oxidu uhličitého a spotrebovaného kyslíka v každej paralelnej vzorke a vyhotoví sa krivka reakcie na dávku na stanovenie hodnôt EC_x. Rýchlosti respirácie indukovanej glukózou (t. j. mg oxidu uhličitého/kg suchej hmotnosti pôdy/h alebo mg kyslíka/suchú hmotnosť pôdy/h) zistené v ošetrených vzorkách po 28 dňoch sa porovnajú s hodnotami zistenými v kontrole. Z týchto údajov sa vypočítajú hodnoty inhibície v percentuálnom vyjadrení pre každú testovanú koncentráciu. Tieto percentuálne hodnoty sa vynesú proti koncentrácii a použijú sa štatistické postupy na výpočet hodnôt EC_x. Hranice spoľahlivosti (p = 0,95) pre vypočítané EC_x sa stanovia tiež s použitím štandardných postupov (15) (16) (17).

2.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Ak sa pri hodnotení výsledkov z testov s agrochemikáliami rozdiel v rýchlostiach respirácie medzi ošetrením s nižšími dávkami (t. j. maximálna očakávaná koncentrácia) a kontrolou rovná alebo je menší ako 25 % pri každom odbere vzoriek po dni 28, môže sa vyhodnotiť, že produkt nemá dlhodobý vplyv na transformáciu uhlíka v pôde. Pri hodnotení výsledkov testov s chemikáliami inými ako agrochemikáliami sa používajú hodnoty EC_{50}, EC_{25} a/alebo EC_{10}.

3. **PODÁVANIE SPRAV**

SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Úplnú identifikáciu použitej pôdy vrátane:

— geografických údajov o mieste (zemepisná šírka, zemepisná dĺžka),

— informácie o histórii miesta (t. j. rastlinný porast, ošetrenia s výrobkami na ochranu rastlín, ošetrenia s hnojivami, náhodná kontaminácia atď.),

— štruktúra využitia (napr. poľnohospodárska pôda, les atď.),

— hĺbka odberu vzoriek (cm),

— obsah piesku/bahna/ílu (% suchej hmotnosti),

— pH (vo vode),

— obsah organického uhlíka (% suchej hmotnosti),

— obsah dusíka (% suchej hmotnosti),

— kapacita výmeny katiónov (mmol/kg),

— počiatočná mikrobiálna biomasa v percentách celkového organického uhlíka,

— údaje o metódach použitých na stanovenie každého parametra,

— všetky informácie týkajúce sa odberu a skladovania vzoriek pôdy,

— údaje o prípadnej preinkubácii pôdy.

▼B

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

— chemické identifikačné údaje, v prípade potreby vrátane štruktúrneho vzorca, čistoty (t. j. v prípade výrobkov na ochranu rastlín percento účinnej látky), obsahu dusíka.

Testovacie podmienky:

— údaje o obohatení pôdy organickým substrátom,

— počet použitých koncentrácií testovanej chemikálie a v prípade potreby zdôvodnenie vybratých koncentrácií,

— údaje o aplikácii testovanej látky do pôdy,

— inkubačná teplota,

— obsah vlhkosti pôdy na začiatku a počas testu,

— použitá metóda inkubácie pôdy (t. j. hromadná alebo ako séria jednotlivých čiastkových vzoriek),

— počet paralelných vzoriek,

— časy odberov.

Výsledky:

— metóda a zariadenie použité na meranie rýchlostí respirácie,

— údaje v podobe tabuliek, vrátane jednotlivých a priemerných hodnôt množstiev oxidu uhličitého alebo kyslíka,

— odchýlka medzi paralelnými a kontrolnými vzorkami,

— vysvetlenie prípadných korekcií pri výpočtoch,

— percentuálna odchýlka v glukózou indukovaných rýchlostiach respirácie pri každom odbere alebo v prípade potreby hodnota EC_{50} s 95 % hranicou spoľahlivosti, iné EC_x (t. j. EC_{25} alebo EC_{10}) s intervalmi spoľahlivosti a graf krivky reakcií na dávku,

— štatistické spracovanie výsledkov v prípade potreby,

— všetky informácie a pozorovania umožňujúce interpretáciu výsledkov.

4. **ODKAZY**

(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 No 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) Heinemeye, r 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 Gegenuber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113 – 120.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99 – 113.

(16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.23. **AERÓBNA A ANAERÓBNA TRANSFORMÁCIA V PÔDE**

1. **METÓDA**

Táto testovacia metóda zodpovedá OECD TG 307 (2002).

1.1. ÚVOD

Táto testovacia metóda je založená na existujúcich usmerneniach (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Metóda opísaná v tejto testovacej metóde je navrhnutá na hodnotenie aeróbnej a anaeróbnej transformácie chemikálií v pôde. Experimenty sa vykonávajú na stanovenie i) miery transformácie testovanej látky a ii) charakteru a miery tvorby a rozkladu produktov transformácie, ktorým rastliny a pôdne organizmy môžu byť vystavené. Takéto štúdie sa vyžadujú pre chemikálie, ktoré sa priamo aplikujú to pôdy alebo ktoré sa môžu dostať do pôdneho prostredia. Výsledky takýchto laboratórnych štúdií sa môžu použiť aj na vypracovanie protokolov pre odbery a analýzy pre príslušné štúdie v teréne.

Aeróbne a anaeróbne štúdie s jedným typom pôdy sú zvyčajne dostačujúce na hodnotenie ciest transformácie (8) (10) (11). Miery transformácie sa stanovia aspoň v troch ďalších pôdach (8) (10).

Na workshope OECD o výbere pôd/sedimentov, ktorý sa konal v talianskom Belgirate v roku 1995 (10), sa dohodlo konkrétne množstvo a typ pôd používaných v tomto teste. Typy testovaných pôd by mali byť reprezentatívne pre environmentálne podmienky v mieste, kde dôjde k použitiu chemikálie alebo uvoľneniu. Napríklad chemikálie, ktoré sa môžu uvoľniť v subtropickom až tropickom podnebí, sa testujú s ferrasolmi alebo nitosolmi (FAO systém). Workshop vydal tiež odporúčania, založené na pokynoch ISO (15), týkajúce sa odberu, manipulácie a skladovania vzoriek pôdy. Používanie ryžových pôd sa v tejto metóde tiež posudzuje.

1.2. DEFINÍCIE

Testovaná látka: každá látka, či ide o východiskovú zlúčeninu alebo príslušné produkty transformácie.

Produkty transformácie: všetky látky, ktoré vzniknú z biotických alebo abiotických transformačných reakcií testovanej látky, vrátane CO_2 a produktov, ktoré sú vo viazaných rezíduách.

Viazané rezíduá: „Viazané rezíduá“ sú zlúčeniny v pôde, rastlinách alebo zvieratách, ktoré pretrvávajú po extrakcii v matrici vo forme východiskovej zlúčeniny alebo jej metabolitu(-ov)/produktov transformácie. Extrakčné metódy nemusia podstatne meniť samotné zlúčeniny alebo štruktúru matrice. Charakter väzby sa čiastočne dá objasniť extrakčnými metódami, ktorými sa mení matrica, a zložitými analytickými technikami. Doposiaľ sa týmto spôsobom identifikovali napríklad kovalentné iónové a sorpčné väzby, ako aj zadržiavanie. Vo všeobecnosti vznik viazaných rezíduí významne znižuje biologickú prístupnosť a dostupnosť (12) [upravené z IUPAC 1984 (13)].

Aeróbna transformácia: reakcie, ktoré sa vyskytujú v prítomnosti molekulárneho kyslíka (14).

▼B

Anaeróbna transformácia: reakcie, ktoré sa vyskytujú v neprítomnosti molekulárneho kyslíka (14).

Pôda: je zmes minerálnych a organických chemických zložiek, pričom organické chemické zložky obsahujú zlúčeniny s vysokým obsahom uhlíka a dusíka a s vysokými molekulovými hmotnosťami a s malými (prevažne mikro-) organizmami. Pôda sa môže spracovávať v dvoch stavoch:

a) nenarušená, ako sa vytvorila v priebehu času, v charakteristických vrstvách s rozličnými typmi pôdy;

b) narušená, ako sa zvyčajne nachádza v poľnohospodársky využívaných oblastiach alebo ako sa vyskytuje pri odbere vzoriek kopaním a použije v tejto testovacej metóde (14).

Mineralizácia: je úplná degradácia organickej zlúčeniny na CO_2 a H_2O v aeróbnych podmienkach a na CH_4, CO_2 a H_2O v anaeróbnych podmienkach. V súvislosti s touto testovacou metódou, ak sa používa zlúčenina označená ^{14}C, mineralizácia znamená rozsiahlu degradáciu, počas ktorej sa označený atóm uhlíka oxiduje za uvoľnenia príslušného množstva $^{14}CO_2$ (14).

Polčas: $t_{0,5}$ je čas, za ktorý sa transformuje 50 % testovanej látky, ak sa transformácia dá opísať kinetikou prvého rádu; je nezávislý od koncentrácie.

DT_{50} (Doba odbúrania 50): je čas, za ktorý sa koncentrácia testovanej látky zníži o 50 %; odlišuje sa od polčasu $t_{0,5}$, ak transformácia nepostupuje podľa kinetiky prvého rádu.

DT_{75} (Doba odbúrania 75): je čas, za ktorý sa koncentrácia testovanej látky zníži o 75 %.

DT_{90} (Doba odbúrania 90): je čas, za ktorý sa koncentrácia testovanej látky zníži o 90 %.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky sa použijú na charakterizáciu a/alebo identifikáciu produktov transformácie spektroskopickými a chromatografickými metódami.

1.4. POUŽITEĽNOSŤ TESTU

Metóda je použiteľná na všetky chemické látky (neoznačené alebo rádioaktívne označené), pre ktoré je k dispozícii analytická metóda s dostatočnou presnosťou a citlivosťou. Je použiteľná na mierne prchavé, neprchavé, vo vode rozpustné alebo vo vode nerozpustné zlúčeniny. Test sa nepoužíva na chemikálie, ktoré sú veľmi prchavé z pôdy (napr. fumiganty, organické rozpúšťadlá), a teda sa pri experimentálnych podmienkach testu nemôžu uchovať v pôde.

▼B

1.5. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

Na meranie miery transformácie sa môže použiť neoznačená alebo označená testovaná látka. Označený materiál sa vyžaduje pri skúmaní ciest transformácie a pri stanovení hmotnostnej bilancie. Odporúča sa označenie pomocou ^{14}C, ale môže použiť aj označenie inými izotopmi, ako napr. ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Značka sa umiestni pokiaľ možno v najstabilnejšej(-ích) časti(-iach) molekuly ([1]). Čistota testovanej látky by mala byť aspoň 95 %.

Pred uskutočnením testu aeróbnej a anaeróbnej transformácie v pôde sú potrebné tieto informácie o testovanej látke:

a) rozpustnosť vo vode (metóda A.6);

b) rozpustnosť v organických rozpúšťadlách;

c) tlak pár (metóda A.4) a Henryho konštanta;

d) rozdeľovací koeficient n-oktanol/voda (metóda A.8);

e) chemická stabilita v tme (hydrolýza) (metóda C.7);

f) pK_a, ak molekula podlieha protonácii alebo deprotonácii [usmernenie OECD 112] (16).

Ďalšie užitočné informácie môžu zahrnovať údaje o toxicite testovanej látky pre pôdne mikroorganizmy [testovacie metódy C.21 a C.22] (16).

Je potrebné mať k dispozícii analytické metódy (vrátane extrakčných a purifikačných metód) na kvantifikáciu a identifikáciu testovanej látky a jej produktov transformácie.

1.6. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Vzorky pôdy sa ošetria testovanou látkou a inkubujú v tme v bankách biometrického typu alebo v prietokových systémoch za kontrolovaných laboratórnych podmienok (pri konštantnej teplote a vlhkosti pôdy). Po príslušných časových intervaloch sa vzorky pôdy extrahujú a analyzujú na východziu látku a na produkty transformácie. Prchavé produkty sa tiež zhromaždia na analýzu s použitím príslušných absorpčných zariadení. S použitím materiálu označeného ^{14}C sa môžu merať rôzne miery mineralizácie testovanej látky zachytením uvoľneného $^{14}CO_2$ a môže sa stanoviť hmotnostná bilancia, vrátane tvorby viazaných rezíduí v pôde.

1.7. KRITÉRIÁ KVALITY

1.7.1. **Regenerácia**

Extrakcia a analýza minimálne dvoch paralelných vzoriek pôdy ihneď po pridaní testovanej látky poskytne prvý dôkaz reprodukovateľnosti analytickej metódy a rovnomerného rozdelenia testovanej látky pri aplikácii. Regenerácie v neskorších štádiách experimentov sú dané príslušnými hmotnostnými bilanciami. Regenerácie by mali byť v rozsahu od 90 % do 110 % pre označené chemikálie (8) a od 70 % do 110 % pre neoznačené chemikálie (3).

([1]) Napríklad, ak testovaná látka obsahuje jeden kruh, označenie tohto kruhu je potrebné; ak testovaná látka obsahuje dva alebo viac kruhov, môžu byť potrebné samostatné štúdie na hodnotenie osudu každého označeného kruhu a na získanie príslušných informácií o tvorbe produktov transformácie.

▼B

1.7.2. **Reprodukovateľnosť a citlivosť analytickej metódy**

Reprodukovateľnosť analytickej metódy (okrem účinnosti extrakcie v počiatočnom štádiu) na kvantifikovanie testovanej látky a produktov transformácie sa môže overiť paralelnou analýzou rovnakého extraktu pôdy inkubovaného dostatočne dlho, aby vznikli produkty transformácie.

Detekčný limit (LOD) analytickej metódy pre testovanú látku a pre produkty transformácie má byť aspoň 0,01 mg/kg pôdy (ako testovaná látka) alebo 1 % aplikovanej dávky, podľa toho ktorá hodnota je nižšia. Je potrebné stanoviť aj kvantifikačný limit (LOQ).

1.7.3. **Presnosť údajov o transformácii**

Regresná analýza koncentrácií testovanej látky v závislosti od času poskytuje príslušné informácie o spoľahlivosti transformačnej krivky a umožňuje výpočet hraníc spoľahlivosti pre polčasy (v prípade kinetiky pseudo prvého rádu) alebo hodnôt DT_{50} a v prípade potreby DT_{75} a DT_{90}.

1.8. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.8.1. **Prístroje a chemické reagencie**

Inkubačné systémy pozostávajú zo statických uzatvorených systémov alebo vhodných prietokových systémov (7) (17). Príklady vhodného prietokového prístroja na inkubáciu pôdy biometrického typu sú znázornené na obrázkoch 1 a 2. Obidva typy inkubačných systémov majú výhody a obmedzenia (7) (17).

Sú potrebné štandardné laboratórne prístroje, a osobitne tieto:

— analytické prístroje, ako napr. GLC-, HPLC-, TLC-zariadenie, vrátane vhodných detekčných systémov na analýzu rádioaktívne označených alebo neoznačených látok alebo inverzná izotopová zrieďovacia metóda,

— identifikačné prístroje (napr. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR atď.),

— kvapalný scintilačný počítač,

— oxidačné činidlo na spaľovanie rádioaktívneho materiálu,

— odstredivka,

— extrakčný prístroj (napríklad centrifugačné kyvety na extrakciu za studena a Soxhletov extraktor na kontinuálnu refluxnú extrakciu),

— prístroje na zvýšenie koncentrácie roztokov a extraktov (napr. rotačná odparka);

— vodný kúpeľ,

— mechanická miešačka (napr. stroj na miesenie, rotačný mixér).

▼B

Použité chemické reagencie zahrnujú napríklad:

— NaOH, analytická kvalita, 2 mol/dm^3 alebo iná vhodná zásada (napr. KOH, etanolamín),

— H_2SO_4, analytická kvalita, 0,05 mol/dm^3,

— etylénglykol, analytická kvalita,

— tuhé absorpčné materiály, napr. nátronové vápno a polyuretánové zátky,

— organické rozpúšťadlá, analytická kvalita, napr. acetón, metanol atď.,

— scintilačná kvapalina.

1.8.2. **Aplikácia testovanej látky**

Aby sa testovaná mohla pridať do pôdy a distribuovať v nej, môže sa rozpustiť vo vode (deionizovanej alebo destilovanej) alebo v prípade potreby v minimálnych množstvách acetónu alebo iných organických rozpúšťadlách (6), v ktorých je testovaná látka dostatočne rozpustná a stabilná. Množstvo zvoleného rozpúšťadla by nemalo mať významný vplyv na mikrobiálnu aktivitu pôdy (pozri oddiely 1.5 a 1.9.2 – 1.9.3). Je potrebné zabrániť, aby sa používali rozpúšťadlá inhibujúce mikrobiálnu aktivitu, ako je chloroform, dichlórmetán a iné halogenované rozpúšťadlá.

Testovaná látka sa môže tiež pridať ako tuhá látka, napr. zmiešaná v kremennom piesku (6) alebo v malých čiastočných vzorkách pôdy, ktoré sa vysušia na vzduchu a sterilizujú. Ak sa testovaná látka pridá s použitím rozpúšťadla, rozpúšťadlo by sa malo odpariť predtým, ako sa čiastočná vzorka s pridanou látkou pridá k pôvodnej nesterilnej vzorke pôdy.

V prípade bežných chemikálií, ktoré sa dostávajú do pôdy najmä prostredníctvom splaškového kalu/aplikácie v poľnohospodárstve, sa testovaná látka najskôr pridá do kalu, ktoré sa potom aplikuje do vzorky pôdy. (pozri oddiely 1.9.2 a 1.9.3)

Použitie zložených produktov sa zvyčajne neodporúča. Použitie zloženého materiálu však môže byť vhodnou alternatívou, napríklad v prípade ťažko rozpustných testovaných látok.

1.8.3. **Pôdy**

1.8.3.1. *Výber pôdy*

Na stanovenie transformačnej cesty sa môže použiť reprezentatívna pôda; piesočnatá hlina alebo prachovitá (bahenná) hlina, alebo hlina alebo hlinitý piesok [podľa FAO a USDA klasifikácie (18)] s pH 5,5 – 8,0, s obsahom organického uhlíka 0,5 % – 2,5 % a mikrobiálnou biomasou s obsahom aspoň 1 % celkového organického uhlíka (10).

Pre štúdie miery transformácie sa použijú aspoň tri ďalšie pôdy predstavujúce rozsah relevantných pôd. Pôdy sa odlišujú v obsahu organického uhlíka, pH, obsahu ílu a mikrobiálnej biomasy (10).

▼B

Všetky pôdy by mali byť charakterizované aspoň týmito vlastnosťami textúry (% piesok, % bahno, % íl) [klasifikácia podľa FAO a USDA (18)], pH, katiónová výmenná kapacita, organický uhlík, objemová hmotnosť, charakteristika retencie vody ([1]) a mikrobiálna biomasa (iba pre aeróbne štúdie). Ďalšie informácie o vlastnostiach pôdy môžu byť užitočné pri interpretácii výsledkov. Na stanovenie charakteristík pôdy sa môžu použiť odporúčané metódy v odkazoch (19) (20) (21) (22) (23). Mikrobiálna biomasa sa stanoví s použitím metódy substrátom indukovanej respirácie (SIR) (25) (26) alebo alternatívnymi metódami (20).

1.8.3.2. *Odber, manipulácia a skladovanie pôd*

Potrebné sú podrobné informácie o histórii miesta v teréne, odkiaľ sa testovaná pôda odobrala. Uvádza sa presná poloha, porast, ošetrenia chemikáliami, ošetrenia organickými a anorganickými hnojivami, prídavky biologických materiálov alebo iné kontaminácie. Na štúdie transformácie sa nepoužijú pôdy, ktoré boli ošetrené testovanou látkou alebo jej štrukturálnymi analógmi v priebehu ostatných štyroch rokov (10) (15).

Pôda má byť čerstvo odobratá z terénu (z horizontu A alebo vrchnej 20 cm vrstvy) s obsahom vody v pôde, ktorý umožní preosiatie. V prípade iných pôd ako ryžové polia sa vzorky neodoberajú počas alebo bezprostredne po dlhých obdobiach (> 30 dní) sucha, mrazu alebo záplav (14). Vzorky sa dopravia tak, aby sa minimalizovali zmeny v obsahu vody v pôde a uchovávajú sa v tme za čo najväčšieho prístupu vzduchu. Na tento účel zvyčajne postačí voľne zaviazané polyetylénové vrecúško.

Pôda by sa mala spracovať čo najskôr po odbere vzoriek. Porast, väčšie kusy pôdnych živočíchov a kamene sa odstránia pred preosiatím cez 2 mm sito, ktorým sa odstránia malé kamienky, živočíchy a zvyšky rastlín. Je potrebné zabrániť nadmernému vysušeniu a rozdrveniu pôdy pred preosiatím (15).

Ak je ťažké odoberať vzorky v zime v teréne (zamrznutá pôda alebo pokrytá vrstvami snehu), môže sa odobrať zo šarže pôdy, uchovávanej v skleníku pod porastom (napr. tráva alebo zmes trávy a ďateliny). V každom prípade sa uprednostňujú štúdie s čerstvo odobratou pôdou z terénu, ale ak sa odobratá a spracovaná pôda musela skladovať pred začiatkom štúdie, musia sa dodržať vhodné skladovacie podmienky a iba na obmedzený čas (4 °C ± 2 °C maximálne tri mesiace), aby sa zachovala mikrobiálna aktivita ([2]). Podrobné pokyny na odber, manipuláciu a skladovanie pôd, ktoré sa použijú na biotransformačné pokusy sa nachádzajú v odkazoch (8) (10) (15) (26) (27).

([1]) Charakteristiku retencie vody v pôde je možné merať ako kapacitu poľa, ako kapacitu zadržiavania vody alebo ako sací tlak vody (pF). Na vysvetlenie pozri dodatok 1. V správe z testu je potrebné uviesť, či charakteristiky retencie vody a objemová hmotnosť pôd boli stanovené v nenarušených vzorkách z terénu alebo narušených (spracovaných) vzorkách.

([2]) Z výsledkov posledného výskumu vyplýva, že vzorky z miernych oblastí sa tiež môžu skladovať pri – 20 °C viac ako tri mesiace (28) (29) bez významných strát mikrobiálnej aktivity.

▼B

Predtým, ako sa spracovaná pôda použije v tomto teste, mala by sa podrobiť preinkubácii na umožnenie kĺčenia a odstránenia semien a na opätovné nastolenie rovnováhy mikrobiálneho metabolizmu po následnej zmene podmienok odberu alebo skladovania na podmienky inkubácie. Vo všeobecnosti je vhodná doba preinkubácie medzi 2 a 28 dňami za teplotných podmienok a vlhkosti približujúcej sa skutočnému testu (15). Čas skladovania a preinkubácie spolu nesmie trvať dlhšie ako tri mesiace.

1.9. VYKONANIE TESTU

1.9.1. **Testovacie podmienky**

1.9.1.1. *Teplota pri teste*

Počas celého obdobia testovania by sa pôdy mali inkubovať v tme pri konštantnej teplote, predstavujúcej klimatické podmienky, kde sa vyskytne použitie alebo uvoľnenie. Pre všetky testované látky, ktoré sa môžu dostať do pôdy v miernom podnebí, sa odporúča teplota 20 °C ± 2 °C. Teplota by sa mala sledovať.

V prípade chemikálií, aplikovaných alebo uvoľnených v chladnejšom podnebí (napr. v severných krajinách počas obdobia jesene/zimy), sa inkubujú ďalšie vzorky pôdy, ale pri nižšej teplote (napr. 10 °C ± 2 °C).

1.9.1.2. *Obsah vlhkosti*

V prípade testov transformácie v aeróbnych podmienkach sa obsah pôdnej vlhkosti ([1]) nastaví a zachová na pF medzi 2,0 a 2,5 (3). Obsah pôdnej vlhkosti sa vyjadruje ako hmotnosť vody na hmotnosť suchej pôdy a pravidelne sa kontroluje (napr. v 2-týždňových intervaloch) vážením v inkubačných bankách a straty vody sa doplnia pridaním vody (pokiaľ možno sterilnej filtrovanej vody z vodovodu). Je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa predchádzalo a minimalizovali straty testovanej látky a/alebo produktov transformácie vyparovaním a/alebo fotodegradáciou (ak sa vyskytuje) počas pridávania vlhkosti.

Pri testoch transformácie v anaeróbnych podmienkach a podmienkach ryžových polí sa pôda saturuje zaplavením.

1.9.1.3. *Aeróbne inkubačné podmienky*

V prietokových systémoch sa aeróbne podmienky zabezpečujú nekontinuálnym premývaním alebo kontinuálnou ventiláciou zvlhčeným vzduchom. V bankách biometrického typu sa vzduch zabezpečuje difúziou.

1.9.1.4. *Sterilné aeróbne podmienky*

Aby sa získali informácie o dôležitosti abiotickej transformácie testovanej látky vzorky, vzorky pôdy sa môžu sterilizovať [sterilizačné metódy pozri v odkazoch (16) a (29)], ošetriť sterilnou testovanou látkou (napr. pridaním roztoku cez sterilný filter) a prevzdušniť zvlhčeným sterilným vzduchom, ako je uvedené v oddiele 1.9.1.3. V prípade ryžových pôd sa pôda a voda sterilizujú a inkubácia sa uskutoční, ako je uvedené v oddiele 1.9.1.6.

([1]) Pôda nemá byť ani príliš mokrá, ani príliš suchá, aby sa zachovalo primerané prevzdušnenie a výživa pôdnej mikroflóry. Odporúčané vlhkosti pôdy pre optimálny mikrobiálny rast sú v rozsahu 40 % – 60 % kapacity zadržiavania vody (WHC) a od 0,1 bar – 0,33 bar (6). Posledný uvedený rozsah zodpovedá rozsahu pF 2,0 – 2,5. Typické obsahy vlhkostí rôznych typov pôdy sú uvedené v dodatku 2.

▼B

1.9.1.5. *Anaeróbne inkubačné podmienky*

Na zistenie a zachovanie anaeróbnych podmienok sa pôda, ošetrená testovanou látkou a inkubovaná za aeróbnych podmienok 30 dní alebo jeden polčas, alebo DT^{50} (podľa toho, ktoré je kratšie), potom zaleje vodou (1 cm – 3 cm vrstva vody) a do inkubačného systému sa vženie inertný plyn (napr. dusík alebo argón) ([1]). Testovací systém musí umožňovať merania, ako napr. pH, koncentrácia kyslíka a redox potenciál, a zapojenie zariadenia na zachytávanie prchavých produktov. Systém biomerického typu musí byť uzatvorený, aby nevnikol vzduch difúziou.

1.9.1.6. *Inkubačné podmienky ryžových polí*

Na štúdiu transformácie v ryžových pôdach sa pôda zaplaví 1 cm – 5 cm vrstvou vody a testovaná látka sa aplikuje do vodnej fázy (9). Odporúča sa hĺbka pôdy aspoň 5 cm. Systém sa prevzdušňuje vzduchom ako za aeróbnych podmienok. Sleduje sa a zaznamená pH, koncentrácia kyslíka a redox potenciál vodnej vrstvy. Pred začatím tranformačných štúdií je potrebná doba preinkubácie aspoň dva týždne (pozri oddiel 1.8.3.2).

1.9.1.7. *Trvanie testu*

Štúdie miery a cesty by nemali byť zvyčajne dlhšie ako 120 dní ([2]) [(3) (6) (8)], pretože potom sa dá očakávať pokles pôdnej mikrobiálnej aktivity s časom v neprirodzenom laboratórnom systéme izolovanom od prírodných revitalizačných procesov. Ak je potrebné charakterizovať rozklad testovanej látky a tvorbu a rozklad hlavných produktov transformácie, štúdie môžu pokračovať dlhšie obdobia (napr. 6 alebo 12 mesiacov) (8). Dlhšie inkubačné doby sa zdôvodnia v správach z testov a doložia sa k nim údaje z meraní biomasy počas týchto dôb a na ich konci.

1.9.2. **Vykonanie testu**

Približne 50 g až 200 g pôdy (vzťahuje sa na suchú hmotnosť) sa umiestni do každej inkubačnej banky (pozri obrázky 1 a 2 v dodatku 3) a pôda sa ošetrí testovanou látkou podľa jednej z metód uvedených v oddiele 1.8.2. Ak sa na aplikáciu testovanej látky používajú organické rozpúšťadlá, odstránia sa z pôdy odparením. Potom sa pôda dôkladne premieša tyčinkou a/alebo pretrepaním banky. Ak sa štúdia uskutočňuje v podmienkach ryžových polí, po aplikácii testovanej látky sa pôda a voda dôkladne premiešajú. Malé alikvótne časti (napr. 1 g) ošetrených pôd sa analyzujú na testovanú látku, aby sa overilo rovnomerné rozdelenie. Alternatívna metóda je uvedená ďalej.

([1]) Aeróbne podmienky prevládajú v povrchových pôdach a dokonca v podpovrchových pôdach, ako je uvedené vo výskumnom projekte, ktorý sponzoruje EÚ [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270 – 277, 17 – 21. August 1992, Sigtuna, Sweden]. Anaeróbne podmienky sa môžu vyskytnúť iba príležitostne počas zaplavenia pôd po dlhotrvajúcich dažďoch alebo v podmienkach ryžových polí na poliach s ryžou.

([2]) Aeróbne štúdie by sa mohli ukončiť pred uplynutím 120 dní za predpokladu, že sa zreteľne dosiahne konečná cesta transformácie a konečná mineralizácia v tom čase. Ukončenie testu je možné po 120 dňoch, alebo keď sa aspoň 90 % testovanej látky transformuje, ale iba ak sa vytvorí aspoň 5 % CO_2.

▼B

Miera ošetrenia by mala zodpovedať najvyššej aplikačnej dávke výrobku na ochranu rastlín, odporúčanej v návode na použite, a rovnomernému zabudovaniu v zodpovedajúcej hĺbke v teréne [napr. vrchná 10 cm vrstva ([1]) pôdy]. Napríklad pre chemikálie, ktoré sa aplikujú na listy alebo na pôdu bez zabudovania, zodpovedajúca hĺbka pre výpočet, koľko chemikálie sa má pridať do každej banky, je 2,5 cm. Pre chemikálie, ktoré sa zabudujú do pôdy, je zodpovedajúca hĺbka presne uvedená v návode na použitie. Pre bežné chemikálie by sa aplikačná dávka mala odhadnúť na základe najvýznamnejšej cesty prieniku; napríklad, ak je hlavná cesta prieniku do pôdy cez splaškový kal, chemikália sa dávkuje do kalu pri koncentrácii, ktorá zodpovedá očakávanej koncentrácii kalu, a množstvo kalu pridaného do pôdy by malo zodpovedať bežnej aplikácii kalu, používanej na poľnohospodárske pôdy. Ak táto koncentrácia nie je na identifikáciu hlavných produktov transformácie dostatočne vysoká, môže byť užitočná inkubácia samostatných vzoriek pôdy s vyššou mierou ošetrenia, ale je potrebné zamedziť priveľkej miere ošetrenia ovplyvňujúcej mikrobiálne funkcie pôdy (pozri oddiely 1.5 a 1.8.2).

Alternatívne sa môže väčšia dávka (t. j. 1 kg až 2 kg) pôdy ošetriť testovanou látkou, dôkladne premiešať vo vhodnom miešacom zariadení a potom preniesť v malých dávkach 50 g až 200 g do inkubačných baniek (napríklad s použitím dávkovačov vzoriek). Malé alikvótne časti (napr. 1 g) ošetrenej pôdy sa analyzujú na testovanú látku, aby sa overilo rovnomerné rozdelenie. Uprednostňuje sa takýto postup, pretože umožňuje rovnomernejšie rozdelenie testovanej látky do pôdy.

Aj neošetrené vzorky pôdy sa inkubujú za rovnakých podmienok (aeróbne) ako vzorky ošetrené testovanou látkou. Tieto vzorky sa používajú na merania biomasy v priebehu štúdií a na ich konci.

Ak sa testovaná látka aplikuje do pôdy rozpustená v organickom (-ých) rozpúšťadle(-ách), vzorky pôdy ošetrené rovnakým množstvom rozpúšťadla(-iel) sa inkubujú za rovnakých podmienok (aeróbne) ako vzorky ošetrené testovanou látkou. Tieto vzorky sa používajú na stanovenia biomasy na začiatku štúdií, počas nich a na ich konci, na overenie účinkov rozpúšťadla(-iel) na mikrobiálnu biomasu.

Banky obsahujúce ošetrenú pôdu sa buď pripoja na prietokový systém opísaný na obrázku 1, alebo uzavrú absorpčnou kolónou znázornenou na obrázku 2 (pozri dodatok 3).

([1]) Výpočet počiatočnej koncentrácie v mieste s použitím tejto rovnice:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{l[m] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d[kg_{soil}/m^3]}$$

C_{soil} = počiatočná koncentrácia v pôde [mg/kg]

A = aplikačná dávka [kg/ha]; l = hrúbka pôdnej vrstvy poľa [m]; d = suchá objemová hmotnosť [kg/m^3].

Spravidla aplikačná dávka 1 kg/ha vytvára koncentráciu 1 mg/kg v 10 cm vrstve (pri objemovej hmotnosti 1 g/cm^3).

▼B

1.9.3. **Odber vzoriek a meranie**

V príslušných časových intervaloch sa odoberú paralelné inkubačné banky a vzorky pôdy sa extrahujú s príslušnými rozpúšťadlami rôznej polarity a analyzujú na testovanú látku a/alebo produkty transformácie. Vhodne zostavená štúdia zahrnuje dostatočný počet baniek tak, aby sa mohli odobrať dve banky pri každom odbere. Odoberajú sa aj absorpčné roztoky alebo tuhé absorpčné materiály v rôznych časových intervaloch (7-dňové intervaly v priebehu prvého mesiaca a po jednom mesiaci 17-dňové intervaly) počas inkubácie každej vzorky pôdy a na jej konci a analyzujú sa na prchavé produkty. Okrem vzorky pôdy odobratej priamo po aplikácii (vzorka z nultého dňa) je potrebné naplánovať aspoň 5 ďalších termínov odberu. Časové intervaly sa zvolia tak, aby sa dala stanoviť schéma rozkladu testovanej látky a schémy tvorby a rozkladu produktov transformácie (napr. 0, 1, 3, 7 dní; 2, 3 týždne; 1, 2, 3 mesiacov atď.).

Ak sa použije testovaná látka, označená ^{14}C, neextrahovateľná rádioaktivita sa kvantifikuje spaľovaním a vypočíta sa hmotnostná bilancia pre každý interval odberu.

V prípade anaeróbnej inkubácie a inkubácie v podmienkach ryžových polí sa pôdne a vodné fázy analyzujú spolu pre testovanú látku a produkty transformácie alebo sa pred extrakciou a analýzou oddelia pomocou filtrácie alebo centrifugácie.

1.9.4. **Nepovinné testy**

Aeróbne, nesterilné štúdie pri ďalších teplotách a vlhkostiach pôdy môžu byť užitočné na posúdenie vplyvu teploty a vlhkosti pôdy na mieru transformácie testovanej látky a/alebo jej produktov transformácie v pôde.

Ďalšiu charakterizáciu neextrahovateľnej rádioaktivity možno skúsiť napríklad superkritickou fluidnou extrakciou.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Množstvá testovanej látky, produktov transformácie, prchavých látok (iba v percentách) a neextrahovateľných látok sa vyjadria v percentách aplikovanej počiatočnej koncentrácie a v prípade potreby ako mg/kg pôdy (vo vzťahu k suchej hmotnosti pôdy) pre každý interval odberu. Hmotnostná bilancia sa uvedie v percentách aplikovanej počiatočnej koncentrácie pre každý interval odberu. Grafické znázornenie koncentrácií testovanej látky v závislosti od času umožní stanovenie jej polčasu transformácie alebo DT_{50}. Mali by sa identifikovať hlavné produkty transformácie a ich koncentrácie by sa tiež mali vyniesť v závislosti od času na znázornenie ich miery tvorby a rozkladu. Hlavný produkt transformácie je každý produkt, ktorý predstavuje ≥ 10 % aplikovanej dávky kedykoľvek počas štúdie.

Zachytené prchavé látky poskytujú dôkazy o možnej prchavosti testovanej látky a jej produktov transformácie z pôdy.

▼B

Presnejšie stanovenia polčasov alebo hodnôt DT_{50}, prípadne hodnôt DT_{75} a DT_{90}, by sa mali získať s použitím výpočtov príslušného kinetického modelu. Polčas a hodnoty DT_{50} by sa mali zaznamenať spolu s opisom použitého modelu, kinetického rádu a determinačného koeficientu (r^2). Kinetika prvého rádu sa uprednostňuje, pokiaľ $r^2 < 0,7$. V prípade potreby by sa výpočty mali použiť aj na hlavné produkty transformácie. Príklady príslušných modelov sú uvedené v odkazoch (31) až (35).

Ak sa štúdie miery transformácie vykonávajú pri rôznych teplotách, miera transformácie sa uvedie ako funkcia teploty v rámci experimentálneho rozsahu teploty s použitím Arrheniovho vzťahu vo forme:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ alebo } lnk = 1nA - \frac{B}{T},$$

kde ln A je regresná konštanta zo zadržania a ln B je regresná konštanta nábehu, prípadne najlepšieho smeru uvoľneného z lineárnej regresie ln k proti l/T, k je množstvová konštanta pri teplote T a T je teplota v kelvinoch. Je potrebné venovať pozornosť obmedzenému rozsahu teplôt, v ktorom platí Arrheniov vzťah v prípade, ak sa transformácia riadi mikrobiálnou aktivitou.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Aj keď sa štúdie uskutočňujú v neprirodzenom laboratórnom systéme, výsledky umožnia posúdiť mieru transformácie testovanej látky a tiež mieru tvorby a rozkladu produktov transformácie v podmienkach v teréne (36) (37).

Štúdia cesty transformácie testovanej látky poskytuje informácie o spôsobe, akým sa aplikovaná látka v pôde štrukturálne mení chemickými a mikrobiálnymi reakciami.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať:

Testovaná látka:

— všeobecný názov, chemický názov, číslo CAS, štruktúrny vzorec [uvádzajúci pozíciu označenia(-í), ak sa použije rádioaktívne označený materiál] a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti (pozri oddiel 1.5),

— čistota (nečistoty) testovanej látky,

— rádiochemická čistota označenej chemikálie a špecifická aktivita (v prípade potreby).

Referenčné látky:

— chemický názov a štruktúra referenčných látok použitých na charakterizáciu a/alebo identifikáciu produktu transformácie.

Testované pôdy:

— údaje o mieste odberu,

— dátum a postup odberu vzoriek pôdy,

▼B

— vlastnosti pôd, ako napr. pH, obsah organického uhlíka, textúra (koľko percent piesku, koľko percent bahna, koľko percent ílu), katiónová výmenná kapacita, objemová hmotnosť, charakteristika retencie vody a mikrobiálna biomasa,

— dĺžka skladovania pôdy a podmienky skladovania (ak sa skladuje).

Testovacie podmienky:

— dátumy uskutočnenia štúdií,

— množstvo použitej testovanej látky,

— použité rozpúšťadlá a metóda aplikácie pre testovanú látku,

— hmotnosť ošetrenej pôdy na začiatku testu a v každom intervale odberu na analýzu,

— opis použitého inkubačného systému,

— miera prietoku vzduchu (iba pre prietokové systémy),

— teplota experimentálnej zostavy,

— obsah pôdnej vlhkosti počas inkubácie,

— mikrobiálna biomasa na začiatku, v priebehu a na konci aeróbnych štúdií,

— pH, koncentrácia kyslíka a redox potenciál na začiatku, v priebehu a na konci anaeróbnych a štúdií v podmienkach ryžových polí,

— extrakčná(-é) metóda(-y),

— metódy kvantifikácie a identifikácie testovanej látky a hlavné produkty transformácie v pôde a absorpčné materiály,

— počet paralelných vzoriek a počet kontrol.

Výsledky:

— výsledok stanovenia mikrobiálnej aktivity,

— opakovateľnosť a citlivosť použitých analytických metód,

— miera regenerácie percentuálne hodnoty pre platnú štúdiu sú uvedené v oddiele 1.7.1),

— tabuľky s výsledkami vyjadrenými v percentách aplikovanej počiatočnej dávky a v prípade potreby ako mg/kg pôdy (vzťahuje sa na suchú hmotnosť),

— hmotnostná bilancia v priebehu štúdií a na ich konci,

— charakterizácia neextrahovateľnej (viazanej) rádioaktivity alebo rezíduí v pôde,

— kvantifikácia uvoľneného CO_2 a iných prchavých látok,

— grafické znázornenie pôdnych koncentrácií proti času pre testovanú látku a v prípade potreby pre hlavné produkty transformácie,

— polčas alebo DT_{50}, DT_{75} a DT_{90} pre testovanú látku a v prípade potreby pre hlavné produkty transformácie, vrátane hraníc spoľahlivosti,

▼B

— posúdenie miery abiotickej degradácie v sterilných podmienkach,

— vyhodnotenie kinetiky transformácie pre testovanú látku a v prípade potreby pre hlavné produkty transformácie,

— v prípade potreby údaje o cestách transformácie,

— diskusia a interpretácia výsledkov,

— nespracované údaje (t. j. chromatogramy vzoriek, vzorové výpočty miery transformácie a prostriedky použité na identifikáciu produktov transformácie).

4. **ODKAZY**

(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) Európska únia (EÚ) (1995). Smernica Komisie 95/36/ES zo 14. júla 1995, ktorou sa mení a dopĺňa smernica Rady 91/414/EHS o umiestnení prípravkov na ochranu rastlín na trh. Príloha II časť A a príloha III časť A: Osud a správanie sa účinnej látky v životnom prostredí.

(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 fur 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) Príloha V k smernici 67/548/EHS.

(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85 – 114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 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, 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 biotransformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105 – 120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59 – 63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., 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, 68 – 69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197 – 200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141 – 146.

▼B

(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181 – 199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In „Environmental Dynamics of Pesticides“. R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135 – 172.

(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 39, 188 – 204.

(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 33, 47 – 60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032 – 1041.

(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83 – 122.

▼B

DODATOK 1

TLAK VODY, KAPACITA POĽA (KP) A KAPACITA ZADRŽIAVANIA VODY (KZV) [1]

Výška vodného stĺpca [cm]	pF [a]	bar [b]	Poznámky
10^7	7	10^4	suchá pôda
$1,6 \times 10^4$	4,2	16	bod vädnutia
10^4	4	10	
10^3	3	1	
6×10^2	2,8	0,6	
$3,3 \times 10^2$	2,5	0,33 [c]	rozsah kapacity poľa [d]
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	KVZ (aproximácia)
1	0	0,001	vodou nasýtená pôda

[a] pF = logaritmus cm vodného stĺpca.
[b] 1 bar = 10^5 Pa.
[c] Zodpovedá približnému obsahu vody 10 % v piesku, 35 % v hline a 45 % v íle.
[d] Kapacita poľa nie je konštantná, ale mení sa s typom pôdy medzi pF 1,5 a 2,5.

Tlak vody sa meria v cm vodného stĺpca alebo v baroch. Kvôli veľkému rozsahu sacieho tlaku sa vyjadruje jednoducho ako hodnota pF, ktorá je zodpovedá logaritmu cm vodného stĺpca.

Kapacita poľa sa definuje ako množstvo vody, ktoré sa môže v prírodnej pôde zachovať proti gravitácii 2 dni po dlhšom období dažďov alebo po dostatočnom zavlažovaní. Stanovuje sa v nenarušenej pôde *in situ* v teréne. Meranie sa teda nepoužíva na narušené laboratórne vzorky pôdy. Stanovené hodnoty KP v narušených pôdach môžu vykazovať veľké systematické odchýlky.

Kapacita zadržiavania vody (KZV) sa stanovuje v laboratóriu s nenarušenou a narušenou pôdou nasýtením stĺpca pôdy vodou prostredníctvom kapilárnej vzlínavosti. Je to osobitne dôležité pre narušené pôdy a môže byť až o 30 % väčšia ako kapacita poľa (1). Je tiež jednoduchšie experimentálne stanoviť spoľahlivé hodnoty KP.

Poznámky

[1] Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

DODATOK 2

OBSAH PÔDNEJ VLHKOSTI (g vody na 100 g suchej pôdy) RÔZNYCH TYPOV PÔDY Z RÔZNYCH KRAJÍN

Typ pôdy	Krajina	Pôdna vlhkosť pri		
		KZV ([1])	pF = 1,8	pF = 2,5
Piesok	Nemecko	28,7	8,8	3,9
Hlinitý piesok	Nemecko	50,4	17,9	12,1
Hlinitý piesok	Švajčiarsko	44,0	35,3	9,2
Prachovitá hlina	Švajčiarsko	72,8	56,6	28,4
Ílovitá hlina	Brazília	69,7	38,4	27,3
Ílovitá hlina	Japonsko	74,4	57,8	31,4
Piesčitá hlina	Japonsko	82,4	59,2	36,0
Prachovitá hlina	USA	47,2	33,2	18,8
Piesčitá hlina	USA	40,4	25,2	13,3

([1]) Kapacita zadržiavania vody.

▼B

DODATOK 3

Obrázok 1

Príklad prietokového prístroja na štúdium transformácie chemikálií v pôde ([1]) ([2])

1: ihlový ventil

2: plynová premývacia fľaša obsahujúca vodu

3: ultramembráma (iba sterilné podmienky), veľkosť pórov 0,2 µm

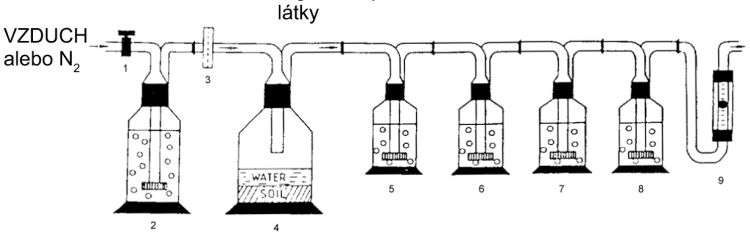
4: banka pôdneho metabolizmu (zaliata vodou iba v prípade anaeróbnych podmienok a podmienok ryžových polí)

5: lapač etylén-glykolom na organické prchavé látky

6: lapač kyselinou sírovou na alkalické prchavé látky

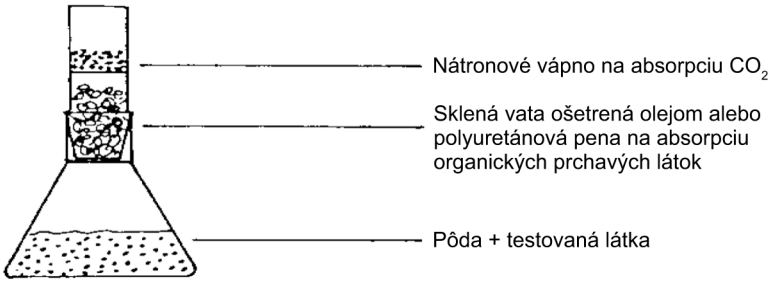
7, 8: lapač hydroxidom sodným na CO_2 a iné kyslé prchavé látky

9: prietokomer



Obrázok 2

Príklad banky biometrického typu na štúdium transformácie chemikálií v pôde ([3])



([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123 – 157.

([2]) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85 – 114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141 – 146.

▼B

C.24. AERÓBNA A ANAERÓBNA TRANSFORMÁCIA V SYSTÉMOCH VODA/SEDIMENT

1. METÓDA

Táto testovacia metóda zodpovedá OECD TG 308 (2002).

1.1. ÚVOD

Chemikálie sa môžu dostať do plytkých alebo hlbokých povrchových vôd takými cestami, ako je priama aplikácia, postrek, odtok, odvodnenie, zneškodňovanie odpadov, priemyselné, domáce alebo poľnohospodárske odpadové vody a atmosférické usadzovanie. Táto testovacia metóda opisuje laboratórnu metódu na hodnotenie aeróbnej a anaeróbnej transformácie organických chemikálií v systémoch voda/sediment. Táto testovacia metóda je založená na existujúcich usmerneniach (1) (2) (3) (4) (5) (6). Na OECD workshope o výbere pôd/sedimentov, ktorý sa konal v talianskom Belgirate v roku 1995 (7) sa konkrétne dohodlo množstvo a typ sedimentov používaných v tomto teste. Tiež sa vydali odporúčania týkajúce sa odberu, manipulácie a skladovania vzoriek sedimentov, ktoré sa zakladajú na pokynoch ISO (8). Takéto štúdie sa vyžadujú pre chemikálie, ktoré sa priamo aplikujú to vody alebo ktoré sa môžu dostať do vodného prostredia vyššie uvedenými cestami.

Podmienky v prírodných systémoch voda/sediment sú často aeróbne vo vrchnej vodnej fáze. Povrchová vrstva sedimentu môže byť buď aeróbna, alebo anaeróbna, zatiaľ čo hlbšie vrstvy sedimentu sú zvyčajne anaeróbne. Aby sa zahrnuli obe tieto možnosti, v tomto dokumente sa opisujú aeróbne aj aneróbne testy. Aeróbny test simuluje aeróbny vodný stĺpec nad aeróbnou vrstvou sedimentu, ktorá je podvrstvená anaeróbnym gradientom. Anaeróbny test simuluje úplný anaeróbny systém voda-sediment. Ak z okolností vyplýva, že je potrebné značne sa odkloniť od týchto odporúčaní, napríklad použiť intaktné jadrá sedimentov alebo sedimenty, ktoré môžu byť vystavené pôsobeniu testovanej látky, sú na tento účel dostupné iné metódy (9).

1.2. DEFINÍCIE

V každom prípade sa použijú medzinárodné jednotky (SI).

Testovaná látka: každá látka, či východisková, alebo príslušné produkty transformácie.

Produkty transformácie: všetky látky, ktoré vzniknú z biotických a abiotických transformačných reakcií testovanej látky, vrátane CO_2 a viazaných rezíduí.

Viazané rezíduá: „Viazané rezíduá“ sú zlúčeniny v pôde, rastlinách alebo zvieratách, ktoré pretrvávajú po extrakcii v matrici vo forme východzej zlúčeniny alebo jej metabolitu(-ov). Extrakčná metóda nemusí podstatne meniť samotné zlúčeniny alebo štruktúru matrice. Charakter väzby sa čiastočne dá objasniť extrakčnými metódami, ktorými sa mení matrica, a zložitými analytickými technikami. Doposiaľ sa identifikovali týmto spôsobom napríklad kovalentné iónové a sorpčné väzby, ako aj zadržiavanie. Vo všeobecnosti vznik viazaných rezíduí významne znižuje biologickú prístupnosť a biologickú dostupnosť (10) [upravené z IUPAC 1984 (11)].

▼B

Aeróbna transformácia: (oxidačná): reakcie, ktoré sa vyskytujú v prítomnosti molekulárneho kyslíka (12).

Anaeróbna transformácia: (redukčná): reakcie, ktoré sa vyskytujú za neprítomnosti molekulárneho kyslíka (12).

Prírodné vody: sú povrchové vody získané z nádrží, riek, potokov atď.

Sediment: je zmes minerálnych a organických chemických zložiek, pričom organické chemické zložky obsahujú zlúčeniny s vysokým obsahom uhlíka a dusíka a s vysokými molekulovými hmotnosťami. Ukladá sa prírodnou vodou a tvorí rozhranie s vodou.

Mineralizácia: je kompletná degradácia organickej zlúčeniny na CO_2, H_2O v aeróbnych podmienkach a na CH_4, CO_2 a H_2O v anaeróbnych podmienkach. V súvislosti s touto testovacou metódou, ak sa používa rádioaktívne označená zlúčenina, mineralizácia znamená rozsiahlu degradáciu molekuly, počas ktorej sa označený atóm uhlíka kvantitatívne oxiduje alebo redukuje za uvoľnenia príslušného množstva $^{14}CO_2$ alebo $^{14}CH_4$.

Polčas, $t_{0,5}$, je čas, za ktorý sa transformuje 50 % testovanej látky, ak sa transformácia dá opísať kinetikou prvého rádu; je nezávislý od koncentrácie.

DT_{50} (Doba odbúrania 50): je čas, za ktorý sa koncentrácia testovanej látky zníži o 50 %.

DT_{75} (Doba odbúrania 75): je čas, za ktorý sa koncentrácia testovanej látky zníži o 75 %.

DT_{90} (Doba odbúrania 90): je čas, za ktorý sa koncentrácia testovanej látky zníži o 90 %.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky by sa mali používať na identifikáciu a kvantifikáciu produktov transformácie spektroskopickými a chromatografickými metódami.

1.4. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

Na meranie miery transformácie sa môže použiť neoznačená alebo izotopom označená testovaná látka, aj keď sa uprednostňuje označený materiál. Označený materiál sa vyžaduje pri skúmaní ciest transformácie a pri stanovení hmotnostnej bilancie. Odporúča sa označenie pomocou ^{14}C, ale môže použiť aj označenie inými izotopmi, ako napr. ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Značka sa umiestni pokiaľ možno v najstabilnejšej(-ích) časti(-iach) molekuly ([1]). Chemická a/alebo rádiochemická čistota testovanej látky by mala byť aspoň 95 %.

Pred uskutočnením testuje potrebné, aby boli k dispozícii tieto informácie:

a) rozpustnosť vo vode (metóda A. 6);

b) rozpustnosť v organických rozpúšťadlách;

c) tlak pár (metóda A.4) a Henryho konštanta;

([1]) Napríklad, ak látka obsahuje jeden kruh, označenie tohto kruhu je potrebné; ak testovaná látka obsahuje dva alebo viac kruhov, samostatné štúdie môžu byť potrebné na hodnotenie osudu každého označeného kruhu a na získanie príslušných informácií o tvorbe produktov transformácie.

▼B

d) rozdeľovací koeficient n-oktanol/voda (metóda A. 8);

e) adsorpčný koeficient (K_d, K_f alebo K_{oc}, podľa potreby) (metóda C. 18);

f) hydrolýza (metóda C.7);

g) disociačná konštanta (pK_a) [usmernenie OECD 112] (13);

h) chemická štruktúra testovanej látky a pozícia izotopového označenia, v prípade potreby.

Poznámka: Zaznamená sa teplota, pri ktorej sa robili tieto merania.

Iné užitočné informácie môžu obsahovať údaje o toxicite testovanej látky pre mikroorganizmy, údaje o rýchlej a/alebo potenciálnej biologickej rozložiteľnosti a údaje o aeróbnej a anaeróbnej transformácii v pôde.

Je potrebné mať k dispozícii analytické metódy (vrátane extrakčných a purifikačných metód) na identifikáciu a kvantifikáciu testovanej látky a jej produktov transformácie vo vode a v sedimente (pozri oddiel 1.7.2).

1.5. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Metóda uvedená v tomto teste využíva systém aeróbnych a anaeróbnych vodných sedimentov (pozri dodatok 1), ktorý umožňuje:

— meranie miery transformácie testovanej látky v systéme voda-sediment,

— meranie miery transformácie testovanej látky v sedimente,

— meranie miery mineralizácie testovanej látky a/alebo jej produktov transformácie (ak sa použije testovaná látka označená ^{14}C),

— identifikáciu a kvantifikáciu produktov transformácie vo vodnej fáze a fáze sedimentu vrátane hmotnostnej bilancie (ak sa použije označená testovaná látka),

— meranie distribúcie testovanej látky a jej produktov transformácie medzi dvoma fázami počas inkubačnej doby v tme (aby sa zabránilo, napríklad, rozmnoženiu rias) pri stálej teplote. Polčasy, hodnoty DT_{50}, DT_{75} a DT_{90} sa stanovia, ak to umožňujú údaje, ale nesmú sa extrapolovať veľmi dlho od doby experimentu (pozri oddiel 1.2).

Aspoň dva sedimenty a ich pridružené vody sú potrebné pre aeróbne a anaeróbne štúdie (7). Môžu sa však vyskytnúť prípady, keď je potrebné použiť viac ako dva vodné sedimenty, napríklad v prípade chemikálie, ktorá sa môže nachádzať v sladkých a/alebo morských vodách.

▼B

1.6. POUŽITEĽNOSŤ TESTU

Metóda je všeobecne použiteľná na všetky chemické látky (neoznačené alebo označené), pre ktoré je k dispozícii analytická metóda s dostatočnou presnosťou a citlivosťou. Je použiteľná na mierne prchavé, neprchavé, vo vode rozpustné alebo vo vode zle rozpustné zlúčeniny. Test sa nepoužíva na chemikálie, ktoré sú veľmi prchavé z vody (napr. fumiganty, organické rozpúšťadlá), a teda sa pri experimentálnych podmienkach testu nemôžu uchovať vo vode.

Metóda sa doteraz používala na skúmanie transformácie chemikálií v sladkých vodách a sedimentoch, ale v zásade sa dá použiť aj na systémy ústí riek a morské systémy. Nie je vhodná na simulovanie podmienok v tečúcich vodách (napr. rieky) alebo podmienok otvoreného mora.

1.7. KRITÉRIÁ KVALITY

1.7.1. **Regenerácia**

Extrakcia a analýza minimálne dvoch paralelných vzoriek vody a sedimentu ihneď po pridaní testovanej látky poskytuje prvý dôkaz reprodukovateľnosti analytickej metódy a rovnomerného rozdelenia testovanej látky pri aplikácii. Regenerácie v neskorších stupňoch experimentov sú dané príslušnými hmotnostnými bilanciami (ak sa použije označený materiál). Regenerácie by mali byť v rozsahu od 90 % do 110 % pre označené chemikálie (6) a od 70 % do 110 % pre neoznačené chemikálie.

1.7.2. **Reprodukovateľnosť a citlivosť analytickej metódy**

Repredukovateľnosť analytickej metódy (okrem počiatočnej účinnosti extrakcie) na kvantifikovanie testovanej látky a produktov transformácie sa môže overiť paralelnou analýzou rovnakého extraktu vzoriek vody alebo sedimentu, ktorý sa inkuboval dostatočne dlho, aby vznikli produkty transformácie.

Detekčný limit (LOD) analytickej metódy pre testovanú látku a pre produkty transformácie má byť aspoň 0,01 mg/kg vo vode alebo sedimente (ako testovaná látka) alebo 1 % počiatočnej dávky, aplikovanej do testovaného systému, podľa toho ktorá hodnota je nižšia. Je potrebné stanoviť aj kvantifikačný limit (LOQ).

1.7.3. **Presnosť údajov o transformácii**

Regresná analýza koncentrácií testovanej látky v závislosti od času poskytuje príslušné informácie o presnosti transformačnej krivky a umožní výpočet hraníc spoľahlivosti pre polčasy (ak platí kinetika pseudo prvého rádu) alebo hodnôt DT_{50} a v prípade potreby DT_{75} a DT_{90}.

1.8. OPIS METÓDY

1.8.1. **Testovaný systém a aparatúra**

Štúdia by sa mala vykonať v sklenených nádobách (t. j. fľaše, centrifugačné kyvety), pokiaľ z predbežných informácií (napr. rozdeľovací koeficient n-oktanol-voda, sorpčné údaje atď.) nevyplýva, že testovaná látka môže priľnúť na sklo, v takomto prípade sa môže uvažovať o použití alternatívneho materiálu, napr. teflónu). Ak je známe, že testovaná látka priľne na sklo, môže sa tento problém vyriešiť pomocou jednej alebo viacerých z týchto metód:

▼B

— stanoviť hmotnosť testovanej látky a produktov transformácie zachytenej na sklo,

— zabezpečiť, aby sa umyli rozpúšťadlom všetky sklenené pomôcky na konci testu,

— použiť zložené výrobky (pozri tiež oddiel 1.9.2),

— použiť väčšie množstvo pomocných rozpúšťadiel na pridávanie testovanej látky do systému; ak sa pomocné rozpúšťadlá používajú, musí to byť pomocné rozpúšťadlo, ktoré nespôsobí solvolýzu testovanej látky.

Príklady typickej pokusnej aparatúry, t. j. plynový prietokový systém a systém biometrického typu, sú znázornené v dodatku 2 a 3 (14). Ďalšie užitočné inkubačné systémy sú uvedené v odkaze (15). Konštrukcia pokusnej aparatúry by mala umožniť výmenu vzduchu alebo dusíka a zachytenie prchavých produktov. Rozmery aparatúry musia byť také, aby boli v súlade s požiadavkami testu (pozri oddiel 1.9.1). Prevzdušnenie sa zabezpečí buď jemným prebublávaním, alebo prepúšťaním vzduchu alebo dusíka nad povrchom vody. V druhom prípade pre lepšiu distribúciu kyslíka alebo dusíka vo vode sa môže odporúčať jemné miešanie vody zvrchu. Vzduch zbavený CO_2 by sa nemal používať, lebo môže spôsobiť zvýšenie pH vody. V každom prípade narušenie sedimentu nie je želateľné a, pokiaľ možno, treba mu zabrániť. Mierne prchavé látky by sa mali testovať v systéme biometrického typu jemným premiešaním povrchu vody. Môžu sa použiť aj uzavreté nádoby s plynnou fázou tvorenou atmosférickým vzduchom alebo dusíkom a internými nádobkami na zachytávanie prchavých produktov (16). Je potrebná pravidelná výmena plynnej fázy v aeróbnom teste, aby sa kompenzovala spotreba kyslíka biomasou.

Vhodné zachytávače na zachytávanie prchavých produktov transformácie obsahujú okrem iného roztoky hydroxidu draselného alebo hydroxidu sodného v koncentrácii 1 mol/dm^3 pre oxid uhličitý ([1]) a etylénglykol, etanolamín alebo 2 % parafín v xyléne pre organické zlúčeniny. Prchavé látky, ktoré sa tvoria za anaeróbnych podmienok, ako napr. metán, sa môžu zachytávať, napríklad molekulovými sitami. Takéto prchavé látky sa môžu spaľovať, napríklad na CO_2 prepúšťaním plynu cez kremennú trubicu naplnenú CuO pri teplote 900 °C a zachytávaním vzniknutého CO_2 v absorbéri s alkalickou látkou (17).

Je potrebné laboratórne zariadenie na chemickú analýzu testovanej látky a produktov transformácie [(t. j. plynová kvapalinová chromatografia (GLC), vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC), chromatografia na tenkej vrstve (TLC), hmotnostná spektroskopia (MS), plynová chromatografia – hmotnostná spektroskopia (GC-MS), kvapalinová chromatografia – hmotnostná spektrometria (LC-MS), jadrová magnetická rezonancia (NMR) atď.], vrátane detekčných systémov pre rádioaktívne označené a neoznačené chemikálie, podľa potreby. Ak sa používa rádioaktívne označený materiál, bude potrebný aj kvapalný scintilačný počítač a oxidačné činidlo na spaľovanie (na spaľovanie vzoriek sedimentu na analýzu rádioaktivity).

V prípade potreby je potrebné ďalšie bežné laboratórne zariadenie na fyzikálno-chemické a biologické stanovenia (pozri tabuľku v oddiele 1.8.2.2), sklenené nádoby, chemikálie a reagencie.

([1]) Keďže tieto alkalické absorpčné roztoky tiež absorbujú oxid uhličitý zo vzduchu pri prevzdušňovaní, ktorý sa tvorí respiráciou pri aeróbnych pokusoch, musia sa v pravidelných intervaloch vymieňať, aby sa zabránilo ich saturácii, a tým strate ich absorpčnej kapacity.

▼B

1.8.2. **Výber a počet vodných sedimentov**

Miesta odberu sa zvolia v súlade s cieľom testu v danej situácii. Pri výbere miest odberu sa musia posúdiť predchádzajúce možné vstupy z poľnohospodárstva, priemyslu alebo domácností do spádovej oblasti a horných tokov. Sedimenty sa nepoužijú, ak boli kontaminované testovanou látkou alebo jej štrukturálnymi analógmi počas predchádzajúcich 4 rokov.

1.8.2.1. *Výber sedimentu*

Na aeróbne štúdie sa zvyčajne používajú dva sedimenty (7). Vybraté dva sedimenty by sa mali odlišovať v obsahu organického uhlíka a textúrou. Jeden sediment by mal mať vysoký obsah organického uhlíka (2,5 % – 7,5 %) a jemnú textúru, druhý sediment by mal mať nízky obsah organického uhlíka (0,5 % – 2,5 %) a hrubú textúru. Rozdiel medzi obsahom organického uhlíka by mal byť zvyčajne aspoň 2 %. „Jemná textúra“ je definovaná ako obsah [íl + bahno] ([1]) > 50 % a „hrubá textúra“ je definovaná ako obsah [íl + bahno] < 50 %. Rozdiel v obsahu [íl + bahno] pre dva sedimenty by mal byť zvyčajne aspoň 20 %. V prípadoch keď sa chemikália môže dostať aj do morských vôd, aspoň jeden z týchto systémov voda-sediment by mal pochádzať z mora.

Pre striktne anaeróbnu štúdiu sa dva sedimenty (vrátane ich pridružených vôd) odoberú z anaeróbnych zón povrchových vodných telies (7). S obidvoma fázami sediment aj voda sa manipuluje opatrne a prepravujú sa takisto opatrne bez prítomnosti kyslíka.

Ďalšie parametre môžu byť dôležité pri výbere sedimentov a je ich potrebné posudzovať podľa jednotlivých prípadov. Napríklad rozsah pH sedimentov by mohol byť dôležitý pri testovaní chemikálií, v prípade ktorých transformácia a/alebo sorpcia môže závisieť od pH. Závislosť sorpcie od pH môže vyjadrovať pK_a testovanej látky.

1.8.2.2. *Charakterizácia vzoriek voda-sediment*

Kľúčové parametre, ktoré sa musia merať a uviesť v správe (s odkazom na použitú metódu) pre vodu aj sediment, a štádium testu, v ktorom sa tieto parametre majú stanoviť, sú zosumarizované v ďalej uvedenej tabuľke. Informácie o metódach na stanovenie týchto parametrov sú uvedené odkazoch (18) (19) (20) (21).

Podľa okolností je potrebné stanoviť a uviesť v správe aj ďalšie parametre [napr. pre sladkú vodu: častice, zásaditosť, tvrdosť, konduktivitu, NO_3/PO_4 (pomer a jednotlivé hodnoty); pre sedimenty: katiónovú výmennú kapacitu, kapacitu zadržiavania vody, uhličitany, celkový dusík a fosfor; a pre morské systémy: soľnatosť]. Analýza sedimentov a vody na nitrát, sulfát, biologicky dostupné železo a prípadne iné akceptory elektrónov môže byť tiež užitočná pri posudzovaní redoxných podmienok najmä vo vzťahu k anaeróbnej transformácii.

([1]) [íl + bahno] je minerálna frakcia sedimentu s veľkosťou častíc < 50 μm.

▼B

Stanovenie parametrov na charakterizáciu vzoriek voda-sediment (7) (22) (23)

Parameter	Štádium postupu testu					
	odber vzoriek v teréne	manipulácia	začiatok aklimatizácie	začiatok testu	priebeh testu	koniec testu
Voda						
Pôvod/zdroj	x					
Teplota	x					
pH	x		x	x	x	x
TOC (celková koncentrácia organického kyslíka)			x	x		x
koncentrácia O_2 (*)	x		x	x	x	x
Redox potenciál (**)			x	x	x	x
Sediment						
Pôvod/zdroj	x					
Hĺbka vrstvy	x					
pH		x	x	x	x	x
Distribúcia veľkosti častíc		x				
TOC (celková koncentrácia organického kyslíka)		x	x	x		x
Mikrobiálna biomasa (**)		x		x		x
Redox potenciál (**)	pozorovanie (farba/vôňa)		x	x	x	x

(*) Z posledných výsledkov výskumu vyplýva, že merania koncentrácií kyslíka vo vode a redox potenciálov nemá mechanistickú ani prognostickú hodnotu, pokiaľ ide o rast a vývoj mikrobiálnych populácií v povrchových vodách (24) (25). Stanovenie biochemickej spotreby kyslíka (BSK, pri odbere vzoriek v teréne, na začiatku a konci testu) a koncentrácií mikro/makro živín Ca, Mg a Mn (na začiatku a konci testu) vo vode a meranie celkového N a celkového P v sedimentoch (pri odbere vzoriek v teréne a na konci testu) môžu byť lepšími nástrojmi na vyjadrenie a posúdenie miery a ciest aeróbnej biotransformácie.

(**) Metóda rýchlosti mikrobiálnej respirácie (26), fumigačná metóda (27) alebo stanovenie počtu mikroorganizmov (napr. baktérie, aktinomycéty, plesne a celkové kolónie) pre aeróbne štúdie; miera metanogenézy pre anaeróbne štúdie.

1.8.3. **Odber, manipulácia a skladovanie**

1.8.3.1. *Odber*

Odber vzoriek sedimentu by sa mal robiť podľa návrhu pokynov ISO pre odber vzoriek spodného sedimentu (8). Vzorky sedimentu by sa mali odobrať z celkovej vrchnej vrstvy 5 cm až 10 cm sedimentu. Pridružené vody by sa mali odobrať z rovnakého miesta alebo lokality a v rovnaký čas ako sediment. Pre anaeróbnu štúdiu by sa mali odobrať vzorky sedimentu a pridruženej vody a dopraviť za neprítomnosti kyslíka (28) (pozri oddiel 1.8.2.1). Niektoré zariadenia na odber vzoriek sú uvedené v odkazoch (8) (23).

▼B

1.8.3.2. *Manipulácia*

Sediment sa oddelí od vody filtráciou a tento sediment sa za mokra preoseje na site s otvormi 2 mm s použitím nadbytku vody z lokality a voda z lokality sa potom odstráni. Potom sa známe množstvá sedimentov a vody zmiešajú v požadovanom pomere (pozri oddiel 1.9.1) v inkubačných bankách a pripravia na aklimatizačné obdobie (pozri oddiel 1.8.4). V prípade anaeróbnej štúdie sa všetky kroky pri manipulácii musia uskutočňovať za neprítomnosti kyslíka (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3. *Uchovávanie*

Dôrazne sa odporúča použiť čerstvo odobraté vzorky sedimentu a vody, ale ak je potrebné skladovanie, sediment a voda sa preoseje, ako je uvedené vyššie, a skladujú sa spolu zaliate vodou (6 cm – 10 cm vodná vrstva), v tme, pri 4 °C ± 2 °C([4]) maximálne 4 týždne (7) (8) (23). Vzorky na použitie v aeróbnych štúdiách sa skladujú za voľného prístupu vzduchu (napr. v otvorených nádobách), zatiaľ čo vzorky na použitie v anaeróbnych štúdiách za neprítomnosti kyslíka. Počas prepravy a skladovania nesmie sediment ani voda zamrznúť a sediment tiež nesmie vyschnúť.

1.8.4. **Príprava vzoriek sedimentu/vody na test**

Pred pridaním testovanej látky by sa mala uskutočniť aklimatizácia každej vzorky sedimentu/vody, ktorá sa umiestni do inkubačnej nádoby, ktorá sa má použiť v základnom teste, a aklimatizácia sa uskutoční za presne rovnakých podmienok ako inkubácia v teste (pozri oddiel 1.9.1). Doba aklimatizácie je čas potrebný na dosiahnutie primeranej stability systému vyjadrenej hodnotou pH, koncentráciou kyslíka vo vode, redox potenciálom sedimentu a vody a makroskopickou separáciou fáz. Doba aklimatizácie by mala zvyčajne trvať medzi jedným a dvoma týždňami a nemala by presiahnuť štyri týždne. Výsledky stanovení uskutočnených počas tohto obdobia by sa mali zaznamenať.

1.9. VYKONANIE TESTU

1.9.1. **Testovacie podmienky**

Test by sa mal uskutočniť v inkubačnom zariadení (pozri oddiel 1.8.1) s pomerom objemu voda/sediment medzi 3:1 a 4:1 a vrstvou sedimentu 2,5 cm (± 0,5 cm) ([1]). Odporúča sa minimálne množstvo 50 g sedimentu (suchá hmotnosť) na inkubačnú nádobu.

Test by sa mal uskutočniť v tme pri stálej teplote v rozmedzí 10 °C až 30 °C. Teplota (20 °C ± 2 °C) je primeraná. V prípade potreby sa môže v jednotlivých prípadoch dodatočne uvažovať o nižšej teplote (napr. 10 °C) v závislosti od informácií, ktoré sa na základe testu požadujú. Inkubačnú teplotu je potrebné sledovať a zaznamenávať.

([1]) Posledné štúdie ukázali, že skladovanie pri 4 °C môže viesť k poklesu obsahu organického uhlíka sedimentu, ktorý môže mať prípadne za následok zníženie mikrobiálnej aktivity (34).

▼B

1.9.2. **Spracovanie a aplikácia testovanej látky**

Používa sa jedna testovacia koncentrácia chemikálie ([1]). Pre chemikálie na ochranu rastlín, ktoré sa priamo aplikujú do vodných telies, maximálna dávka uvedená na označení je maximálna aplikačná dávka, ktorá sa vypočíta vo vzťahu na povrch vody v testovacej nádobe. Vo všetkých ostatných prípadoch by koncentrácia, ktorá sa má použiť, mala vychádzať z výpočtov environmentálnych emisií. Je potrebné venovať pozornosť na zabezpečenie toho, aby sa na charakterizáciu cesty transformácie a tvorby a rozkladu produktov transformácie použila primeraná koncentrácia testovanej látky. Môže byť potrebné použiť vyššie dávky (napr. 10-násobné) v situáciách, keď sa koncentrácie testovanej látky približujú k detekčným limitom na začiatku štúdie a/alebo sa hlavné produkty transformácie nedajú jasne stanoviť, keď ich podiel tvorí 10 % aplikačnej dávky testovanej látky. Ak sa však použijú vyššie testovacie koncentrácie, nemali by mať významný nepriaznivý účinok na mikrobiálnu aktivitu systému voda-sediment. Aby sa dosiahla konštantná koncentrácia testovanej látky v nádobách rôznych rozmerov, môže byť potrebné zvážiť prispôsobenie na množstvo použitého materiálu na základe hĺbky vodného stĺpca v nádobe vo vzťahu k hĺbke vody v teréne (predpokladá sa, že bude 100 cm, ale môžu sa použiť iné hĺbky). Príklady výpočtu pozri v dodatku 4.

V ideálnom prípade by sa mala testovaná látka aplikovať ako vodný roztok do vodnej fázy testovaného systému. Ak je to nevyhnuté, povoľuje sa použiť nízke množstvá vodou zmiešateľných rozpúšťadiel (ako napr. acetón, etanol) na aplikáciu a distribúciu testovanej látky, ale nemali by presiahnuť 1 obj. % a nemali by mať nepriaznivé účinky na mikrobiálnu aktivitu testovaného systému. Pri príprave vodného roztoku testovanej látky je potrebné dávať pozor – na zabezpečenie úplnej homogenity môže byť potrebné použiť stĺpcové usporiadanie generátora a premiešanie. Po pridaní vodného roztoku do testovaného systému sa odporúča jemné premiešanie vodnej fázy tak, aby sa čo najmenej narušil sediment.

Použitie zložených prípravkov sa bežne neodporúča, pretože zložky prípravku môžu ovplyvniť distribúciu testovanej látky a/alebo produktov transformácie medzi vodnou fázou a fázou sedimentu. Použitie zloženého materiálu však môže byť vhodnou alternatívou, napríklad v prípade vo vode ťažko rozpustných testovaných látok.

Počet inkubačných nádob závisí od počtu odberov (pozri oddiel 1.9.3). Je potrebné použiť dostatočný počet testovaných systémov tak, aby sa na každý odber mohli použiť dva systémy. Ak sa používajú kontrolné jednotky každého systému voda/sediment, nemali by sa ošetrovať testovanou látkou. Kontrolné jednotky sa môžu použiť na stanovenie mikrobiálnej biomasy sedimentu a celkového organického uhlíka vody a sedimentu na konci štúdie. Dve kontrolné jednotky (t. j. jedna kontrolná jednotka každého vodného sedimentu) sa môže použiť na sledovanie požadovaných parametrov v sedimente a vode počas doby aklimatizácie (pozri tabuľku v oddiele 1.8.2.2). Dve ďalšie kontrolné jednotky sa musia použiť v prípade, keď sa testovaná látka aplikuje s použitím rozpúšťadla na stanovenie nepriaznivých účinkov na mikrobiálnu aktivitu testovaného systému.

([1]) Test s druhou koncentráciou môže byť užitočný pre chemikálie, ktoré sa dostanú do povrchových vôd rôznymi cestami vstupu, výsledkom čoho sú značne rozdielne koncentrácie, pokiaľ sa nižšia koncentrácia dá analyzovať s dostatočnou presnosťou.

▼B

1.9.3. **Trvanie testu a odber vzoriek**

Trvanie experimentu by zvyčajne nemalo byť dlhšie ako 100 dní (6) a malo by pokračovať až do stanovenia cesty degradácie a modelu distribúcie voda/sediment, alebo kým sa transformáciou rozloží a/alebo vyprchá 90 % testovanej látky. Malo by sa vykonať aspoň šesť odberov (vrátane času nula) s nepovinnou predbežnou štúdiou (pozri oddiel 1.9.4), ktorá sa použije na stanovenie vhodného režimu odberov vzoriek a trvania testu, pokiaľ nebudú k dispozícii dostačujúce údaje o testovanej látke z predchádzajúcich štúdií. Pre hydrofóbne testované látky môžu byť potrebné ďalšie odbery v priebehu počiatočného štádia štúdie, aby sa stanovila miera distribúcie medzi vodnou fázou a fázou sedimentu.

V dobe príslušných odberov sa všetky inkubačné nádoby (paralelne) odoberú na analýzu. Sediment a voda nad ním sa analyzujú samostatne ([1]). Povrchová voda by sa mala opatrne odstrániť tak, aby sa čo najmenej narušil sediment. Extrakcia a charakterizácia testovanej látky a produkty transformácie by sa mali uskutočniť podľa príslušných analytických postupov. Je potrebné venovať pozornosť, aby sa odstránil materiál, ktorý sa môže naadsorbovať na inkubačnú nádobu alebo na rúrky, ktoré slúžia na prepojenie pri zachytávaní prchavých látok.

1.9.4. **Nepovinný predbežný test**

Ak sa trvanie a režim odberov vzoriek nedá určiť z iných príslušných štúdií o testovanej látke, môže sa usúdiť, že je vhodné vykonať nepovinný predbežný test, ktorý by sa uskutočnil za rovnakých testovacích podmienok, aké sú navrhnuté pre konečnú štúdiu. Príslušné experimentálne podmienky a výsledky z predbežného testu, ak sa uskutoční, by sa mali stručne zaznamenávať.

1.9.5. **Merania a analýza**

Koncentrácia testovanej látky a produktov transformácie pri každom odbere vo vode a sedimente by sa mala stanoviť a zaznamenať (ako koncentrácia a ako percentuálny podiel použitého množstva). Vo všeobecnosti by sa mali identifikovať produkty transformácie stanovené pri $\geq$ 10 % použitej rádioaktivity v celom systéme voda-sediment pri ktoromkoľvek odbere, pokiaľ neexistuje iný riadne odôvodnený postup. Produkty transformácie, pre ktoré sa koncentrácie trvale zvyšujú počas štúdie, by sa taktiež mali posúdiť na identifikáciu, aj keď ich koncentrácie nepresahujú limity uvedené vyššie, lebo to môže byť dôkazom perzistencie. Toto je potrebné posúdiť na základe jednotlivých prípadov s odôvodneniami, ktoré sa uvedú v správe.

Výsledky zo systémov na zachytávanie plynov/prchavých látok (CO_2 a iné, t. j. prchavé organické látky) by sa mali zaznamenať pri každom odbere. Mala by sa zaznamenať miera mineralizácie. Neextrahovateľné (viazané) rezíduá v sedimente sa zaznamenajú pri každom odbere.

([1]) V prípadoch, keď môže ľahko dôjsť k rýchlej reoxidácii anaeróbnych produktov transformácie, treba zachovať anaeróbne podmienky počas odberu vzoriek a analýzy.

▼B

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Celková hmotnostná bilancia alebo regenerácia (pozri oddiel 1.7.1) pridanej rádioaktivity sa vypočíta pri každom odbere. Výsledky sa zaznamenajú ako percentuálna hodnota pridanej rádioaktivity. Distribúcia rádioaktivity medzi vodou a sedimentom sa zaznamenáva ako koncentrácie a percentuálne hodnoty pri každom odbere.

Polčas, DT_{50} a v prípade potreby DT_{75} a DT_{90} testovanej látky sa vypočítajú spolu s ich hranicami spoľahlivosti (pozri oddiel 1.7.3). Informácie o miere rozptylu testovanej látky vo vode a sedimente sa získajú na základe použitia príslušných vyhodnocovacích nástrojov. K nim môže patriť použitie kinetiky pseudo prvého rádu, empirické techniky (konštrukcia krivky bod po bode), ktoré používajú grafické alebo numerické riešenia a komplexnejšie vyhodnotenia s použitím napríklad jednoduchých alebo niekoľkonásobných kazetových modelov. Ďalšie informácie je možné získať z odkazov (35) (36) (37).

Všetky prístupy majú svoje silné a slabé stránky a odlišujú sa v komplexnosti. Predpoklad kinetiky prvého rádu môže byť prílišným zjednodušením procesov degradácie a distribúcie, ale ak je možné, poskytuje hodnotu (rýchlostnú konštantu alebo polčas), ktorá je ľahko zrozumiteľná a má zmysel pre simulačné modelovanie a výpočty očakávaných environmentálnych koncentrácií. Výsledkom empirických prístupov alebo lineárnych transformácií môže byť lepšie prispôsobenie kriviek údajom, a preto umožňujú lepšie stanovenie polčasov, hodnôt DT_{50} a v prípade potreby DT_{75} a DT_{90}. Použitie odvodených konštánt je však obmedzené. Kazetové modely môžu vytvoriť množstvo užitočných konštánt, ktoré majú význam pri hodnotení rizika, ktoré opisuje mieru degradácie v rôznych kazetách a distribúciu chemikálie. Používajú sa na stanovenie rýchlostných konštánt na tvorbu a degradáciu hlavných produktov transformácie. V každom prípade sa zvolená metóda musí zdôvodniť a experimentátor demonštrovať graficky a/alebo štatisticky správnosť prispôsobenia.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— všeobecný názov, chemický názov, číslo CAS, štruktúrny vzorec [uvádzajúci pozíciu označenia(-í), ak sa použije rádioaktívne označený materiál] a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— čistota (nečistoty) testovanej látky,

— rádiochemická čistota označenej chemikálie a molárna aktivita (v prípade potreby).

▼B

Referenčné látky:

— chemický názov a štruktúra referenčných látok použitých na charakterizáciu a/alebo identifikáciu produktov transformácie.

Testované sedimenty a vody:

— umiestnenie a opis miesta (miest) odberu vzoriek vodného sedimentu vrátane, ak je to možné, predchádzajúcej kontaminácie,

— všetky informácie týkajúce sa odberu, skladovania (ak sa uskutočnilo) a aklimatizácie systémov voda-sediment,

— charakteristiky vzoriek voda-sediment, ako sú uvedené v tabuľke v oddiele 1.8.2.2.

Testovacie podmienky:

— použitý systém testovania (napr. prietokový, biometrický, spôsob ventilácie, metóda miešania, objem vody, hmotnosť sedimentu, výška vodnej vrstvy a vrstvy sedimentu, rozmer testovacích nádob atď.),

— aplikácia testovanej látky na testovaný systém: použitá testovaná koncentrácia, počet paralelných a kontrolných vzoriek, spôsob aplikácie testovanej látky (napr. prípadného použitia rozpúšťadla) atď.,

— inkubačná teplota,

— počet odberov,

— extrakčné metódy a účinnosti, ako aj analytické metódy a detekčné limity,

— metódy na charakterizáciu/identifikáciu produktov transformácie,

— odchýlky od protokolu testu alebo testovacích podmienok počas štúdie.

Výsledky:

— číselné hodnoty nespracovaných údajov reprezentatívnych analýz (všetky nespracované údaje sa musia uchovávať v SLP archíve),

— opakovateľnosť a citlivosť použitých analytických metód,

— miera regenerácie (percentuálne hodnoty pre platnú štúdiu sú uvedené v oddiele 1.7.1),

— tabuľky s výsledkami vyjadrené ako % aplikovanej dávky a v mg/kg vo vode, sedimente a celkovom systéme (iba %) pre testovanú látku a v prípade potreby pre produkty transformácie a neextrahovateľnú rádioaktivitu,

— hmotnostná bilancia v priebehu a na konci štúdií,

— grafické znázornenie transformácie vo vodných frakciách a frakciách sedimentu a v celkovom systéme (vrátane mineralizácie),

— miera mineralizácie,

▼B

— polčas, hodnoty DT_{50} a v prípade potreby DT_{75} a DT_{90} pre testovanú látku a v prípade potreby pre hlavné produkty transformácie vrátane hraníc spoľahlivosti vo vode, sedimente a celkovom systéme,

— vyhodnotenie kinetiky transformácie testovanej látky a v prípade potreby hlavných produktov transformácie,

— údaje o cestách transformácie, v prípade potreby,

— diskusia k výsledkom.

4. **ODKAZY**

(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, 631 – 637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with 14C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661 – 667.

(18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

(21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038 – 1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop „A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests“, 3 – 4 July 1991.

(23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8 – 10. November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858 – 2868.

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, 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, 197 – 203.

(27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation extraction method.

(28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13 – 21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850 – 857.

(30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527 – 1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499 – 1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of 14C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597 – 3603.

(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

(34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, 961 – 968.

(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 39, 187 – 203.

(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 33, 47 – 60.

(37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases, 1349 – 1354.

▼B

DODATOK 1

USMERNENIE K AERÓBNYM A ANAERÓBNYM TESTOVANÝM SYSTÉMOM

Aeróbny testovaný systém

Aeróbny testovaný systém opísaný v tejto testovacej metóde pozostáva z aeróbnej vodnej vrstvy (zvyčajné koncentrácie kyslíka v rozsahu od 7 mg/l do 10 mg/l) a vrstvy sedimentu, aeróbnej na povrchu a anaeróbnej pod povrchom [zvyčajné priemerné redox potenciály (E_h) v anaeróbnej zóne sedimentu v rozsahu od – 80 do – 190 mV]. Nad povrchom vody v každej inkubačnej jednotke sa preženie zvlhčený vzduch, aby sa vo vrchnej časti zabezpečil dostatok kyslíka.

Anaeróbny testovaný systém

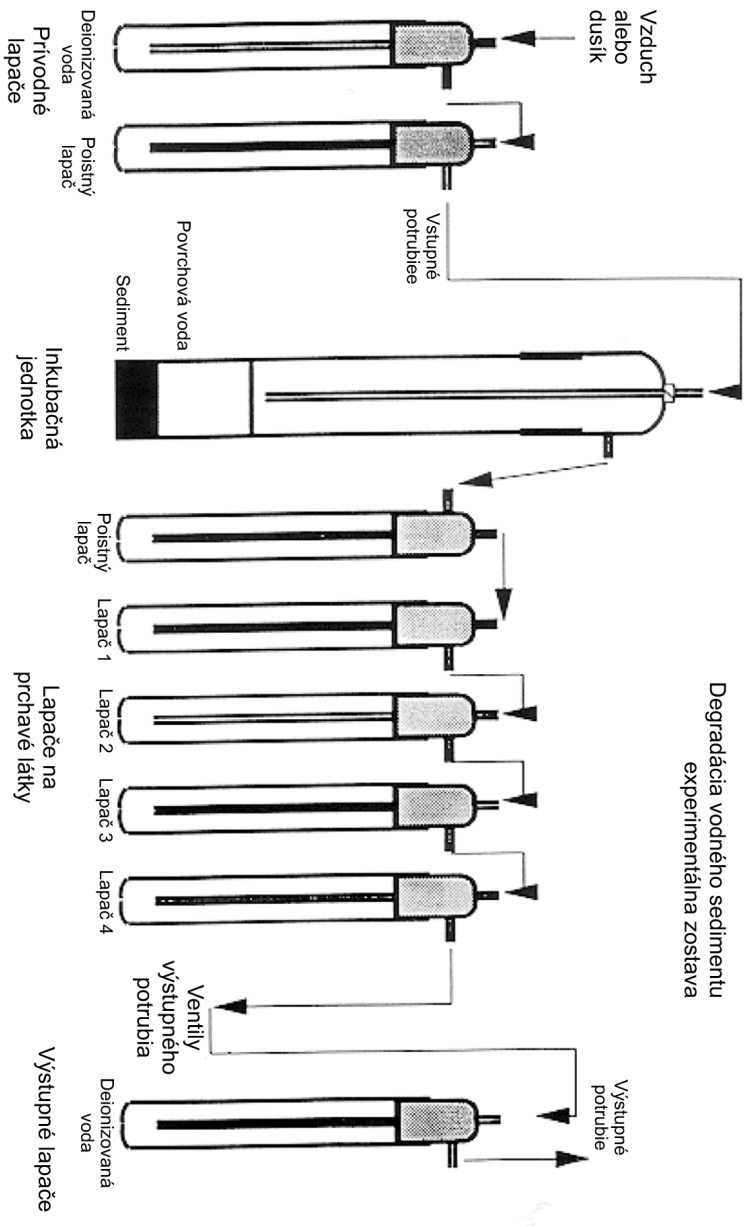
Pre anaeróbny testovaný systém je postup testu v podstate rovnaký, ako je uvedené pre aeróbny systém, s tou výnimkou, že zvlhčený dusík sa preženie nad povrchom vody v každej inkubačnej jednotke, aby sa vo vrchnej časti zachoval dostatok dusíka. Sediment a voda sa pokladajú za anaeróbne, keď je redox potenciál (E_h) nižší ako – 100 mV.

V anaeróbnom teste vyhodnotenie mineralizácie zahrnuje meranie uvoľneného oxidu uhličitého a metánu.

▼B

DODATOK 2

PRÍKLAD PLYNOVÉHO PRIETOKOVÉHO PRÍSTROJA

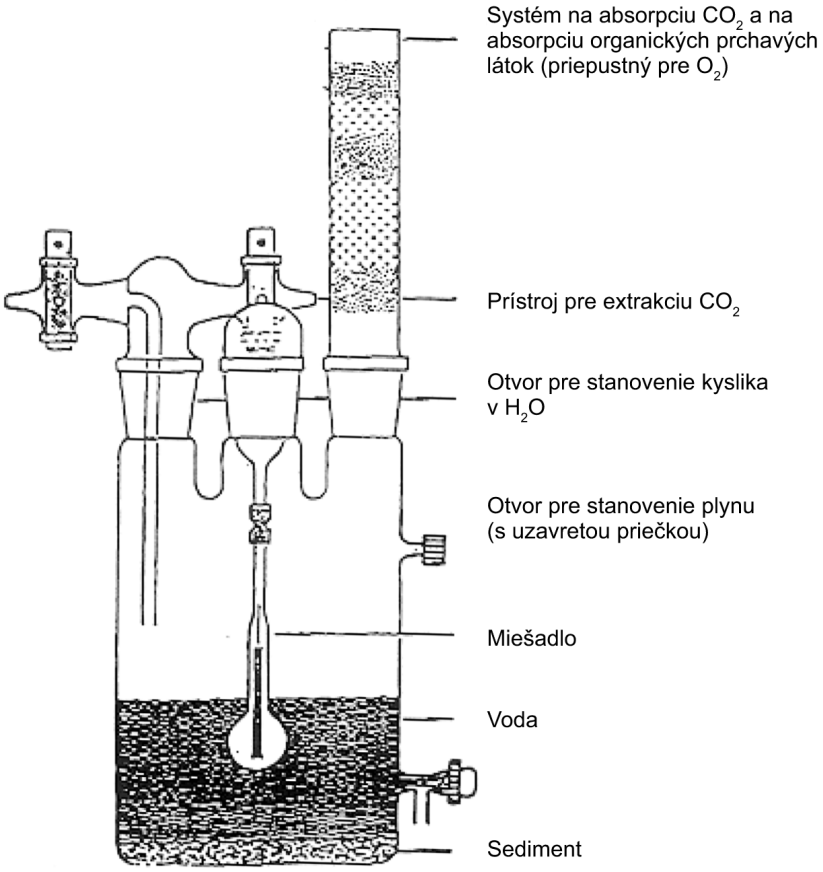


Bezpečnostný lapač, prázdny
Lapač 1:
etylénglykol na zachytenie organických látok
Lapač 2:
kyselina sírová 0,1 M na zachytenie alkalických prchavých látok
Lapač 3 a 4:
hydroxid sodný 2 M na zachytenie CO_2 a iných kyslých prchavých látok

▼B

DODATOK 3

PRÍKLAD BIOMETRICKÉHO PRÍSTROJA



▼B

DODATOK 4

PRÍKLAD VÝPOČTU PRE APLIKAČNÚ DÁVKU V TESTOVACÍCH NÁDOBÁCH

Vnútorný priemer valca:	= 8 cm
Výška vodného stĺpca bez sedimentu:	= 12 cm
Povrch: $3{,}142 \times 4^2$	= 50,3 cm^2
Aplikačná dávka: 500 g testovanej látky/ha zodpovedá 5 µg/cm^2	
Celkove µg: $5 \times 50{,}3$	= 251,5 µg
Vzťah množstva k výške vodného stĺpca 100 cm: $12 \times 251{,}5 \div 100$	= 30,18 µg
Objem vodného stĺpca: $50{,}3 \times 12$	= 603 ml
Koncentrácia vo vode: $30{,}18 \div 603$	= 0,050 µg/ml alebo 50 µg/l

▼M1

C.25. AERÓBNA MINERALIZÁCIA V POVRCHOVEJ VODE – SIMULAČNÝ TEST BIODEGRADÁCIE

1. METÓDA

Táto metóda je rovnocenná s OECD TG 309 (2004) (1).

1.1. ÚVOD

Cieľom tohto testu je stanoviť časový priebeh biodegradácie testovanej látky pri nízkej koncentrácii v aeróbnej prírodnej vode a kvantifikovať zistenia formou vyjadrenia kinetických rýchlostí. Tento simulačný test je laboratórny dávkový test trepačkovej banky na stanovenie rýchlostí aeróbnej biodegradácie organických látok vo vzorkách prírodnej povrchovej vody (sladkej, poloslanej alebo morskej). Je založený na ISO/DIS 14592 – 1 (2) a obsahuje aj prvky z testovacích metód C.23 a C.24 (3) (4). Voliteľne sa môže v prípade dlhodobých testov nahradiť dávkový postup semikontinuálnym postupom, aby sa zabránilo degenerácii testovaného mikrokozmu. Základným cieľom simulačného testu je stanoviť mineralizáciu testovanej látky v povrchovej vode a mineralizácia tvorí základ vyjadrenia kinetiky degradácie. Voliteľný druhý cieľ testu však slúži na získanie informácií o primárnej degradácii a vzniku hlavných transformačných produktov. Identifikácia transformačných produktov a prípadne kvantifikácia ich koncentrácií sú osobitne dôležité v prípade veľmi pomaly mineralizujúcich látok (napr. s polčasmi pre celkový zvyškový ^{14}C presahujúcimi 60 dní). Na identifikáciu a kvantifikáciu hlavných produktov transformácie sa musia kvôli analytickým obmedzeniam obvykle používať vyššie koncentrácie testovanej látky (napr. > 100 μg/l).

Nízka koncentrácia v tomto teste znamená koncentráciu (napr. menej ako 1 μg/l až 100 μg/l), ktorá je dostatočne nízka na zabezpečenie toho, aby kinetika biodegradácie získaná z testu odrážala koncentrácie predpokladané v prostredí. V porovnaní s celkovým množstvom biologicky odbúrateľných uhlíkových substrátov dostupných v prírodnej vode použitej v teste bude testovaná látka prítomná v nízkej koncentrácii slúžiť ako sekundárny substrát. Z toho vyplýva, že predpokladaná kinetika biodegradácie je prvého poriadku („nerastová“ kinetika) a že testovaná látka sa môže dať odbúrať „kometabolizmom“. Z kinetiky prvého poriadku vyplýva, že rýchlosť degradácie (mg/L/day) je úmerná koncentrácii látky, ktorá sa časom znižuje. V prípade pravej kinetiky prvého poriadku špecifická degradačná rýchlostná konštanta k nie je závislá od času a koncentrácie. Znamená to, že k významne nemení svoju hodnotu počas pokusu a pridávanou koncentráciou medzi pokusmi sa nemení. Podľa definície sa špecifická degradačná rýchlostná konštanta rovná relatívnej zmene koncentrácie za čas: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Aj keď sa obvykle predpokladá kinetika prvého poriadku za predpísaných podmienok, za určitých okolností môžu byť vhodnejšie iné kinetiky. Odchýlky od kinetiky prvého poriadku sa môžu pozorovať napríklad vtedy, ak jav prenosu hmoty, ako napr. rýchlosť difúzie, obmedzuje skôr rýchlosť biotransformácie ako rýchlosť biologickej reakcie. Údaje sa dajú takmer vždy opísať kinetikou pseudoprvého poriadku pri akceptácii závislosti rýchlostnej konštanty od koncentrácie.

▼M1

Informácie o biologickej odbúrateľnosti testovanej látky pri vyšších koncentráciách (napr. zo štandardných skríningových testov), ako aj informácie o abiotickej odbúrateľnosti, produktoch transformácie a príslušných fyzikálnochemických vlastnostiach musia byť pred testom k dispozícii ako pomôcka pri plánovaní pokusu a interpretácii výsledkov. Použitie testovaných látok označených ^{14}C a stanovenie fázového rozdelenia ^{14}C na konci testu umožní stanoviť konečnú biologickú odbúrateľnosť. Ak sa použije neoznačená testovaná látka, možno odhadnúť iba konečnú biodegradáciu, ak sa testuje vyššia koncentrácia a všetky známe produkty transformácie sú známe.

1.2. VYMEDZENIE POJMOV

Primárna biodegradácia: Štrukturálna zmena (transformácia) chemickej látky mikroorganizmami, ktorá má za následok stratu chemickej identity.

Funkčná biodegradácia: Štrukturálna zmena (transformácia) chemickej látky mikroorganizmami, ktorá má za následok stratu špecifickej vlastnosti.

Konečná aeróbna biodegradácia: Rozloženie chemickej látky mikroorganizmami v prítomnosti kyslíka na oxid uhličitý, vodu a minerálne soli všetkých ostatných prítomných prvkov (mineralizácia) a vznik novej biomasy a organických mikrobiálnych produktov biosyntézy.

Mineralizácia: Rozloženie chemickej látky alebo organického materiálu mikroorganizmami v prítomnosti kyslíka na oxid uhličitý, vodu a minerálne soli všetkých ostatných prítomných prvkov.

Lag fáza: Dosiahnutý čas od začiatku testu do prispôsobenia degradujúcich mikroorganizmov a do zvýšenia stupňa biodegradácie chemickej látky alebo organického materiálu na úroveň stanoviteľnosti (napr. 10 % maximálnej teoretickej biodegradácie alebo menej v závislosti od presnosti meracej techniky).

Maximálna úroveň biodegradácie: Stupeň biodegradácie chemickej látky alebo organickej hmoty v teste zaznamenaný v percentách, po ktorom sa už žiadna ďalšia biodegradácia neuskutoční.

Primárny substrát: Súbor prírodných zdrojov uhlíka a energie, ktoré zabezpečujú rast a udržiavanie mikrobiálnej biomasy.

Sekundárny substrát: Zložka substrátu prítomná v takej nízkej koncentrácii, že jej degradáciou by sa príslušným mikroorganizmom dodali iba nepatrné množstvá uhlíka a energie v porovnaní s uhlíkom a energiou dodanými degradáciou hlavných zložiek substrátu (primárne substráty).

Degradačná rýchlostná konštanta: Rýchlostná konštanta prvého poriadku alebo pseudoprvého poriadku k (d^{-1}), ktorá vyjadruje rýchlosť procesov degradácie. Pre dávkový pokus sa k odhadne zo začiatočnej časti degradačnej krivky získanej po ukončení lag fázy.

▼M1

Polčas, $t_{1/2}$ (d): Termín používaný na charakterizáciu rýchlosti reakcie prvého poriadku. Je to časový interval, ktorý zodpovedá poklesu koncentrácie o faktor 2. Polčas a degradačná rýchlostná konštanta sú vo vzťahu vyjadrenom rovnicou $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Polčas degradácie, DT_{50} (d): Termín používaný na kvantifikáciu výsledku biodegradačných testov. Je to časový interval vrátane lag fázy, potrebný na dosiahnutie hodnoty 50 % biodegradácie.

Detekčný limit (LOD) a kvantifikačný limit (LOQ): Detekčný limit (LOD) je koncentrácia látky, pod ktorou nemožno odlíšiť identitu látky od analytických údajov. Kvantifikačný limit (LOQ) je koncentrácia látky, pod ktorou nemožno stanoviť koncentráciu s prípustnou presnosťou.

Rozpustený organický uhlík (DOC): Tá časť organického uhlíka vo vzorke vody, ktorá sa nedá odstrániť špecifickým oddelením fáz, napríklad centrifugáciou 15 minút pri 40 000 ms^{-2} alebo membránovou filtráciou s použitím membrán s pórmi s priemerom 0,2 μm –0,45 μm.

Celková aktivita organického ^{14}C (TOA): Celková aktivita ^{14}C spojená s organickým uhlíkom.

Aktivita rozpusteného organického ^{14}C (DOA): Celková aktivita ^{14}C spojená s rozpustených organickým uhlíkom.

Aktivita časticového organického ^{14}C (POA): Celková aktivita ^{14}C spojená s organickým uhlíkom v časticiach.

1.3. POUŽITEĽNOSŤ TESTU

Tento simulačný test sa dá použiť na neprchavé alebo mierne prchavé organické látky testované pri nízkych koncentráciách. Pri použití baniek, ktoré umožňujú prístup vzduchu (napr. s vatovými zátkami), sa môžu látky s Henryho konštantami menšími ako približne 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (pribl. 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) v podstate pokladať za neprchavé. Pri použití uzavretých baniek s plynnou fázou možno testovať mierne prchavé látky (s Henryho konštantami < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ alebo < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$) bez strát z testovacieho systému. Ak sa pri odstraňovaní CO_2 nevykonajú príslušné opatrenia, môže sa vyskytnúť strata látok označených ^{14}C. Za takýchto okolností môže byť potrebné, aby sa CO_2 zachytil v internom absorbéri s alkalickým hydroxidom alebo aby sa použil externý absorpčný systém na CO_2 (priame stanovenie $^{14}CO_2$, pozri dodatok 3). Na stanovenie kinetiky biodegradácie musia byť koncentrácie testovanej látky nižšie ako jej rozpustnosť vo vode. Je však potrebné pripomenúť, že hodnoty rozpustnosti vo vode z literatúry môžu byť značne vyššie ako rozpustnosť testovanej látky v prírodných vodách. Prípadne sa môže rozpustnosť testovacích látok, ktoré sú mimoriadne zle rozpustné vo vode, stanoviť tak, že sa použijú testované prírodné vody.

Môže sa použiť metóda na simuláciu biodegradácie v povrchovej vode bez hrubých častíc („pelagický test“) alebo v kalnej povrchovej vode, ktorá sa môže vyskytovať napr. v blízkosti rozhrania voda/sediment („test suspendovaného sedimentu“).

▼M1

1.4. PRINCÍP TESTU

Test sa uskutočňuje v dávkach tak, že sa inkubuje testovaná látka buď iba s povrchovou vodou („pelagický test“), alebo s povrchovou vodou doplnenou o suspendované tuhé látky/sediment 0,01 až 1 g/L sušiny („test suspendovaného sedimentu“) na simuláciu vodného toku so suspendovanými tuhými látkami alebo resuspendovaným sedimentom. Koncentrácia suspendovaných tuhých látok/sedimentu v spodnom rozsahu tohto intervalu je typická pre väčšinu povrchových vôd. Testovacie banky sa inkubujú v tme pri teplote prostredia za aeróbnych podmienok a miešania. Na účely stanovenia kinetiky degradácie sa musia použiť minimálne dve rozdielne koncentrácie testovanej látky. Koncentrácie sa musia navzájom odlišovať o faktor 5 až 10 a mali by predstavovať predpokladaný rozsah koncentrácií v prostredí. Maximálna koncentrácia testovanej látky nesmie byť vyššia ako 100 µg/L, ale uprednostňujú sa maximálne testované koncentrácie nižšie ako 10 µg/L alebo menej, aby sa zabezpečilo, že biodegradácia prebieha podľa kinetiky prvého poriadku. Najnižšia koncentrácia nesmie byť vyššia ako 10 µg/L, ale uprednostňujú sa najnižšie testované koncentrácie 1 – 2 µg/L alebo menej ako 1 µg/L. S použitím obchodne dostupných látok označených ^{14}C možno uskutočniť náležitú analýzu takejto nízkej koncentrácie. Pre analytické obmedzenia často nemožno stanoviť koncentráciu testovanej látky s potrebnou presnosťou, ak sa použije testovaná látka pri koncentrácii ≤ 100 µg/L (pozri druhý odsek v oddiele 1.7.2). Môžu sa použiť vyššie koncentrácie testovanej látky (> 100 µg/L a niekedy > 1 mg/L) na identifikáciu a kvantifikáciu hlavných produktov transformácie alebo vtedy, ak nie je dostupná špecifická analytická metóda s nízkym detekčným limitom. Ak sa testujú vysoké koncentrácie testovanej látky, môže sa stať, že sa nebudú dať použiť výsledky na stanovenie degradačnej konštanty prvého poriadku a polčas, keďže degradácia pravdepodobne nebude prebiehať podľa kinetiky prvého poriadku.

Ak sa použije špecifická chemická analýza, sleduje sa degradácia v príslušných časových intervaloch a meria sa buď zvyškový ^{14}C, alebo zvyšková koncentrácia testovanej látky. Označenie najstabilnejšej časti molekuly ^{14}C zabezpečuje stanovenie celkovej mineralizácie, zatiaľ čo označenie ^{14}C najmenej stabilnej časti molekuly, ako aj použitie špecifickej analýzy umožňuje iba vyhodnotenie primárnej biodegradácie. Najstabilnejšia časť však nemusí zahŕňať relevantnú funkčnú časť molekuly (ktorá môže súvisieť so špecifickou vlastnosťou, ako napr. toxicita, bioakumulácia atď.). V tomto prípade môže byť potrebné otestovať látku označenú ^{14}C vo funkčnej časti na sledovanie eliminácie špecifickej vlastnosti.

1.5. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

V tomto teste sa môžu použiť rádioaktívne označené aj neoznačené testované látky. Odporúča sa technika označenia ^{14}C a označenie musí byť spravidla na najstabilnejšej časti(-iach) molekuly (pozri aj oddiel 1.4). Pre látky obsahujúce viac ako jeden aromatický kruh sa prednostne označí ^{14}C jeden alebo viac uhlíkov v každom kruhu. Okrem toho sa označí ^{14}C jeden alebo viac uhlíkov na oboch stranách ľahko degradovateľných väzieb. Chemická a/alebo rádiochemická čistota testovanej látky musí byť > 95 %. V prípade rádioaktívne označených látok sa uprednostňuje špecifická aktivita v hodnote približne 50 µCi/mg (1,85 MBq) alebo viac, aby sa umožnili merania ^{14}C v testoch s nízkymi začiatočnými koncentráciami. Musia byť dostupné tieto informácie o testovanej látke:

▼**M1**

— rozpustnosť vo vode [metóda A.6],

— rozpustnosť v organickom(-ých) rozpúšťadle(-ách) (látky použité s rozpúšťadlom alebo s nízkou rozpustnosťou vo vode),

— disociačná konštanta (pKa), ak je látka náchylná na protonizáciu alebo deprotonizáciu [OECD TG 112] (5),

— tlak pár [metóda A.4] a Henryho konštanta,

— chemická stabilita vo vode a v tme (hydrolýza) [metóda C.7].

Ak sa testujú vo vode málo rozpustné látky v morskej vode, môže byť takisto osožné poznať vysoľovací koeficient (alebo „Sečenovovov koeficient“) K^s, ktorý je definovaný výrazom: log (S/S') = K^s C_m, kde S je rozpustnosť látky v čerstvej vode a S' je rozpustnosť látky v morskej vode a C_m je molárna koncentrácia soli.

Ak sa test vykonáva ako „test suspendovaného sedimentu“, musia byť k dispozícii aj tieto informácie:

— rozdeľovací koeficient n-oktanol/voda [metóda A.8],

— adsorpčný koeficient [metóda C.18].

Ostatné osožné informácie môžu zahŕňať:

— environmentálnu koncentráciu, ak je známa alebo odhadnutá,

— toxicitu testovanej látky pre mikroorganizmy [metóda C.11],

— ľahkú a/alebo prirodzenú biodegradovateľnosť [metódy C.4 A – F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)],

— aeróbnu alebo anaeróbnu biodegradovateľnosť v štúdiách transformácie v pôde a systémoch sediment/voda [metódy C.23, C.24].

1.6. REFERENČNÁ LÁTKA

Ako referenčnú látku je potrebné použiť látku, ktorá sa za aeróbnych podmienok bežne ľahko odbúrava (napr. anilín alebo benzoát sodný). Predpokladaný časový interval pre degradáciu anilínu a benzoátu sodného je obvykle menej ako 2 týždne. Účelom referenčných látok je zabezpečiť, aby mikrobiálna aktivita testovanej vody bola v určitých hraniciach, t. j. aby voda obsahovala aktívnu mikrobiálnu populáciu.

▼M1

1.7. KRITÉRIÁ KVALITY

1.7.1. **Výťažnosť**

Hneď po pridaní testovanej látky sa musí každá počiatočná koncentrácia preveriť stanovením aktivity ^{14}C alebo chemickou analýzou v prípade neoznačených látok minimálne s jednou paralelnou vzorkou. Poskytnú sa tým informácie o použiteľnosti a opakovateľnosti analytickej metódy a o homogenite rozdelenia testovanej látky. Obvykle sa v následnej analýze údajov skôr používa nameraná počiatočná aktivita ^{14}C alebo koncentrácia testovanej látky ako nominálna koncentrácia, keďže sa tým kompenzujú straty kvôli adsorpcii a chybám pri dávkovaní. Pre testovanú látku ^{14}C je úroveň výťažnosti na konci pokusu daná hmotnostnou bilanciou (pozri posledný odsek v oddiele 1.8.9.4). V ideálnom prípade by mala byť radioaktívne označená hmotnostná bilancia v rozsahu od 90 % do 110 %, zatiaľ čo analytická presnosť v prípade neoznačených testovaných látok by mala viesť k počiatočnej výťažnosti medzi 70 % a 110 %. Tieto rozsahy je potrebné interpretovať ako ciele a nemali by sa používať ako kritériá pre prípustnosť testu. Voliteľne sa pre testovanú látku a pre hlavné produkty transformácie môže analytická presnosť stanoviť pri nižšej koncentrácii ako počiatočná koncentrácia.

1.7.2. **Opakovateľnosť a citlivosť analytickej metódy**

Opakovateľnosť analytickej metódy (vrátane účinnosti počiatočnej extrakcie) na kvantifikáciu testovanej látky a produktov transformácie sa v prípade potreby musí preveriť piatimi paralelnými analýzami jednotlivých extraktov povrchovej vody.

Detekčný limit (LOD) analytickej metódy pre testovanú látku a pre produkty transformácie musí byť aspoň 1 % z počiatočného množstva aplikovaného na testovací systém, ak je to možné. Limit kvantifikácie (LOQ) musí byť rovný alebo menší ako 10 % použitej koncentrácie. Chemická analýza mnohých organických látok a ich produktov transformácie často vyžaduje, aby sa testovaná látka použila v pomerne vysokej koncentrácii, t. j. > 100 μg/L.

1.8. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.8.1. **Zariadenie**

Test sa môže vykonávať v Erlenmeyerových alebo valcovitých bankách vhodnej kapacity (napr. 0,5 alebo 1,0 litra) uzatvorených silikónovými alebo gumovými zátkami, alebo v sérových bankách s uzávermi neprepúšťajúcimi CO_2 (napr. s butylkaučukovou zátkou). Ďalšia možnosť je vykonať test s použitím viacerých baniek a zužitkovať celé banky aspoň v dvoch paralelkách v každom časovom intervale (pozri posledný odsek v oddiele 1.8.9.1). Pre neprchavé testované látky, ktoré nie sú rádioaktívne označené, nie sú potrebné plynotesné zátky ani uzávery, vhodné sú voľné vatové zátky, ktoré zabraňujú kontaminácii z ovzdušia (pozri druhý odsek v oddiele 1.8.9.1). Mierne prchavé látky sa musia testovať v systéme biometrického typu jemným premiešavaním vodného povrchu. Na zabránenie bakteriálnej kontaminácii sa nádoby môžu prípadne pred použitím sterilizovať zahriatím alebo autoklávovaním. Okrem toho sa môže použiť toto štandardné laboratórne zariadenie:

— trepačka alebo magnetické miešadlá na nepretržité miešanie testovacích baniek,

▼M1

— centrifúga,

— pH meter,

— turbidimeter na nefelometrické merania zákalu,

— pec alebo mikrovlnná pec na stanovenia sušiny,

— prístroj na membránovú filtráciu,

— autokláv alebo pec na tepelnú sterilizáciu sklených nádob,

— zariadenia na manipuláciu s látkami označenými ^{14}C,

— zariadenie na kvantifikáciu aktivity ^{14}C vo vzorkách z roztokov na zachytávanie CO_2 a v prípade potreby zo vzoriek sedimentu,

— analytické zariadenie na stanovenie testovanej (a referenčnej) látky, ak sa používa špecifická chemická analýza (napr. plynová chromatografia, vysokotlaková kvapalinová chromatografia).

1.8.2. **Zásobné roztoky testovanej látky**

Na prípravu zásobných roztokov testovaných a referenčných látok sa používa deionizovaná voda (pozri prvý odsek v oddiele 1.8.7). Deionizovaná voda musí byť zbavená látok, ktoré môžu byť toxické pre mikroorganizmy, a rozpustený organický uhlík (DOC) nesmie tvoriť viac ako 1 mg/L (6).

1.8.3. **Odber a preprava povrchovej vody**

Miesto odberu povrchovej vody sa zvolí v súlade s cieľom testu v danej situácii. Pri výbere miest odberu sa musia posúdiť predchádzajúce možné vstupy z poľnohospodárstva, priemyslu alebo domácností. Ak je známe, že vodné prostredie bolo kontaminované testovanou látkou alebo jej štrukturálnymi analógmi v priebehu predchádzajúcich štyroch rokov, nesmie sa použiť na odber testovanej vody, pokiaľ preskúmanie rýchlostí degradácie v miestach, ktoré už boli vystavené pôsobeniu, nie je výslovným cieľom výskumného pracovníka. V mieste odberu sa zmeria pH a teplota vody. Ďalej je potrebné zaznamenať hĺbku odberu vzorky a vzhľad vzorky vody (napr. farbu a zakalenie) (pozri oddiel 3). Stanoví sa koncentrácia kyslíka a/alebo redoxný potenciál vo vode a v povrchovej vrstve sedimentu na dôkaz aeróbnych podmienok, pokiaľ to nie je zrejmé z posúdenia vzhľadu a predchádzajúcich skúseností s týmto miestom. Povrchová voda sa prepravuje v dôkladne vyčistenej nádobe. Počas prepravy nesmie teplota vzorky výrazne prekročiť teplotu používanú v teste. Odporúča sa chladenie pri 4 °C, ak preprava trvá viac ako 2 až 3 hodiny. Vzorka vody nesmie byť zamrznutá.

▼M1

1.8.4. **Skladovanie a príprava povrchovej vody**

Test je potrebné prednostne začať do nasledujúceho dňa po odbere vzorky. Skladovanie vody je v prípade potreby nevyhnutné minimalizovať a nesmie v žiadnom prípade prekročiť maximálne 4 týždne. Vzorka vody sa do použitia udržiava pri 4 °C za prístupu vzduchu. Pred použitím sa odstránia hrubé častice, napr. filtráciou cez nylonový filter približne s 100 μm veľkosťou ôk alebo cez hrubý papierový filter, alebo sedimentáciou.

1.8.5. **Príprava vody doplnenej o sediment (voliteľné)**

Pre test suspendovaného sedimentu sa pridá povrchový sediment do baniek obsahujúcich prírodnú vodu (filtrovanú na účely odstránenia hrubých častíc, ako je uvedené v oddiele 1.8.4), aby sa získala suspenzia; koncentrácia suspendovaných tuhých látok musí byť medzi 0,01 a 1 g/L. Povrchový sediment musí pochádzať z rovnakého miesta, z ktorého bola odobratá vzorka vody. V závislosti od konkrétneho vodného prostredia môže byť povrchový sediment charakterizovaný buď vysokým obsahom organického uhlíka (2,5 % –7,5 %) a jemnou textúrou, alebo nízkym obsahom organického uhlíka (0,5 % –2,5 %) a hrubou textúrou (2). Povrchový sediment sa môže pripraviť takto: extrahujte niekoľko jadier sedimentov s použitím skúmavky z priesvitného plastu, odrežte vrchné aeróbne vrstvy (z povrchu do hĺbky max. 5 mm) hneď po odbere vzorky a spojte ich dohromady. Výsledná vzorka sedimentu sa musí prepravovať v nádobe s veľkou plynnou fázou, aby sa sediment udržiaval v aeróbnych podmienkach (ochlaďte na 4 °C, ak preprava trvá viac ako 2 až 3 hodiny). Vzorka sedimentu sa suspenduje v testovanej vode v pomere 1: 10 a do použitia sa udržiava pri 4 °C za prístupu vzduchu. Skladovanie sedimentu je v prípade potreby nevyhnutné minimalizovať a nesmie v žiadnom prípade prekročiť maximálne 4 týždne.

1.8.6. **Semikontinuálny postup (voliteľné)**

Môže byť potrebné predĺžiť inkubáciu (niekoľko mesiacov), ak sa vyskytuje dlhá lag fáza predtým, ako možno stanoviť významnú degradáciu testovanej látky. Ak je toto známe z predchádzajúceho testovania látky, test možno začať s použitím semikontinuálneho postupu, ktorý umožňuje pravidelné obnovovanie časti testovanej vody alebo suspenzie (pozri dodatok 2). Alternatívne sa môže bežný dávkový test zmeniť na semikontinuálny test, ak sa nedosiahne žiadna degradácia testovanej látky počas približne 60 dní testovania s použitím dávkového postupu (pozri druhý odsek v oddiele 1.8.8.3).

1.8.7. **Pridávanie testovanej (alebo referenčnej) látky**

Pre látky s vysokou rozpustnosťou vo vode (> 1 mg/L) a nízkou prchavosťou (Henryho konštanty < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ alebo < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) sa môže pripraviť zásobný roztok v deionizovanej vode (pozri oddiel 1.8.2); do testovacích nádob sa pridá príslušný objem zásobného roztoku, aby sa dosiahla požadovaná koncentrácia. Je potrebné, aby bol objem každého pridaného zásobného roztoku čo možno najmenší (< 10 % konečného objemu kvapaliny, ak je to možné). Ďalší postup je rozpustiť testovanú látku vo väčšom objeme testovanej vody, ktorá môže byť alternatívou použitia organických rozpúšťadiel.

▼M1

Ak je to nevyhnutné, pripravia sa zásobné roztoky neprchavých látok s nízkou rozpustnosťou vo vode s použitím prchavého organického rozpúšťadla, ale množstvo pridaného rozpúšťadla do testovacieho systému nesmie byť vyššie ako 1 objemové % a nesmie mať škodlivé účinky na mikrobiálnu aktivitu. Rozpúšťadlo nesmie ovplyvniť stabilitu testovanej látky vo vode. Rozpúšťadlo sa musí odstrániť až do extrémne malého množstva tak, aby významne nezvýšilo koncentráciu DOC testovanej vody alebo suspenzie. Je to potrebné skontrolovať špecifickou analýzou pre látku alebo ak je možné, analýzou DOC (6). Je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa množstvo preneseného rozpúšťadla obmedzilo na čo najnižšiu potrebnú mieru, a zabezpečiť, aby sa množstvo testovanej látky dalo rozpustiť v konečnom objeme testovanej vody. Môžu sa použiť iné techniky na pridávanie testovanej látky do testovacích nádob, ako je uvedené v (7) a (8). Ak sa používa organické rozpúšťadlo na aplikáciu testovanej látky, s kontrolami s rozpúšťadlom obsahujúcimi testovanú vodu (bez žiadnych prídavných látok) a testovanú vodu s pridanou referenčnou látkou sa musí zaobchádzať rovnako ako s aktívnymi testovacími nádobami doplnenými o testovanú látku v nosiči, ktorým je rozpúšťadlo. Účelom kontrol s rozpúšťadlom je preskúmať prípadné škodlivé účinky na mikrobiálnu populáciu spôsobené rozpúšťadlom, ako naznačuje degradácia referenčnej látky.

1.8.8. **Testovacie podmienky**

1.8.8.1. *Teplota pri teste*

Inkubácia sa musí vykonávať v tme (prednostne) alebo v difúznom svetle pri regulovanej teplote (± 2 °C), čo môže byť teplota terénu alebo štandardná teplota 20 °C – 25 °C. Teplota terénu môže byť buď aktuálna teplota vzorky v čase odberu vzorky, alebo priemerná teplota terénu v mieste odberu.

1.8.8.2. *Miešanie*

Musí sa zabezpečiť miešanie nepretržitým trepaním alebo miešaním, aby sa zachovala suspenzia častíc a mikroorganizmov. Miešanie tiež uľahčuje prenos kyslíka z plynnej fázy do kvapaliny tak, že možno náležite zachovať aeróbne podmienky. Umiestnite banky na trepačku (trepanie približne pri 100 rpm) alebo použite magnetické miešanie. Miešanie musí byť nepretržité. Trepanie alebo miešanie musí byť čo najmiernejšie, avšak také, aby sa neustále zachovala homogénna suspenzia.

1.8.8.3. *Dĺžka testu*

Dĺžka testu obvykle nemá presiahnuť 60 dní, pokiaľ sa nepoužíva semikontinuálny postup s pravidelným obnovovaním testovanej suspenzie (pozri oddiel 1.8.6 a dodatok 2). Čas testu v prípade dávkového testu sa môže predĺžiť maximálne na 90 dní, ak sa degradácia testovanej látky začala počas prvých 60 dní. Degradácia sa monitoruje v príslušných časových intervaloch stanovením zvyškovej aktivity ^{14}C alebo uvoľneného $^{14}CO_2$ (pozri oddiel 1.8.9.4) a/alebo chemickou analýzou (oddiel 1.8.9.5). Inkubačný čas musí byť dostatočne dlhý na vyhodnotenie degradačného procesu. Prednostne by miera degradácie mala byť vyššia ako 50 %; pre pomaly degradovateľné látky miera degradácie musí byť dostatočná (obvykle vyššia ako 20 % degradácia) na zabezpečenie stanovenia kinetickej degradačnej rýchlostnej konštanty.

▼M1

V testovacom systéme sa musia vykonávať pravidelné merania koncentrácie pH a kyslíka, pokiaľ z predchádzajúcich skúseností z podobných testov so vzorkami vôd a sedimentu odobratých z rovnakého miesta nevyplýva zbytočnosť takýchto meraní. Za určitých podmienok by metabolizmus primárnych substrátov pri oveľa vyšších koncentráciách vo vode alebo sedimente mohol mať za následok dostatočné uvoľnenie CO_2 a vyčerpanie kyslíka, ktoré významne zmenia experimentálne podmienky počas testu.

1.8.9. **Postup**

1.8.9.1. *Príprava baniek na pelagický test*

Preneste príslušný objem testovanej vody do testovacích baniek, do približne jednej tretiny objemu banky a najmenej okolo 100 ml. Ak sa používajú viaceré banky (aby sa umožnilo zužitkovanie celých baniek v každom čase odberu vzoriek), je vhodný objem testovanej vody tiež približne 100 ml, keďže malé objemy vzoriek môžu ovplyvňovať dĺžku lag fázy. Testovaná látka sa pridáva zo zásobného roztoku, ako je uvedené v oddieloch 1.8.2 a 1.8.7. Je potrebné použiť minimálne dve rozdielne koncentrácie testovanej látky odlišujúce sa o faktor 5 až 10 na stanovenie kinetiky degradácie a výpočet kinetickej degradačnej rýchlostnej konštanty. Obe zvolené koncentrácie musia byť menšie ako 100 μg/L a prednostne v rozmedzí < 1 – 10 μg/L.

Uzavrite banky zátkami alebo uzávermi neprepúšťajúcimi vzduch a CO_2. Pre neprchavé testované chemické látky, neoznačené ^{14}C, sú vhodné voľné vatové zátky, ktoré zabraňujú kontaminácii z ovzdušia (pozri oddiel 1.8.1), za predpokladu, že všetky hlavné produkty degradácie sú známe ako neprchavé a ak sa používa nepriame stanovenie CO_2 (pozri dodatok 3).

Inkubujte banky pri zvolenej teplote (pozri oddiel 1.8.8.1). Na začiatku testu odoberte vzorky na chemickú analýzu alebo stanovenia ^{14}C (t. j. predtým ako sa začne biodegradácia; pozri oddiel 1.7.1) a potom v príslušných časových intervaloch v priebehu testu. Odber vzoriek sa môže vykonať odoberaním čiastočných vzoriek (napr. 5 ml alikvóty) z každej paralelky alebo zužitkovať celé banky v každom čase odberu vzoriek. Mineralizácia testovanej látky sa môže stanoviť buď nepriamo, alebo priamo (pozri dodatok 3). Obvykle je potrebných minimálne päť odberov počas degradačnej fázy (t. j. po ukončení lag fázy) na stanovenie spoľahlivej rýchlostnej konštanty, pokiaľ sa nedá odôvodniť, že pre rýchlo degradujúce látky sú postačujúce tri odbery. Pre látky, ktoré sa počas degradačnej fázy nedegradujú rýchlo, možno ľahko uskutočniť viac meraní, a preto sa na stanovenie k musí použiť viac experimentálnych bodov. Nedá sa stanoviť pevný harmonogram pre odber vzoriek, lebo rýchlosť biodegradácie je premenlivá, ale odporúča sa, ak je degradácia pomalá, odoberať vzorky raz do týždňa. Ak je testovaná látka rýchlo degradovateľná, odber vzoriek sa musí uskutočniť jedenkrát za deň počas prvých troch dní a potom každý druhý alebo tretí deň. Za určitých okolností, ako napr. v prípade veľmi rýchlo hydrolyzujúcich látok, môže byť potrebné odoberať vzorky v hodinových intervaloch. Odporúča sa, aby sa uskutočnila predbežná štúdia pred testom na stanovenie vhodných intervalov odberov vzoriek. Ak musia byť vzorky k dispozícii pre ďalšie špecifické analýzy, odporúča sa odobrať viac vzoriek a potom vybrať tie, ktoré sa budú analyzovať na konci pokusu na základe obrátenej stratégie, t. j. posledné vzorky sa analyzujú prvé (pozri druhý odsek v oddiele 1.8.9.5 pre pokyny o stabilite vzoriek počas skladovania).

▼**M1**

1.8.9.2. *Počet baniek a vzoriek*

Pripravte dostatočný počet testovacích baniek, aby ste mali k dispozícii:

— testovacie banky; minimálne dve banky pre každú koncentráciu testovanej látky (prednostne minimálne 3) alebo viac testovaných baniek pre každú koncentráciu, ak sa zužitkujú celé banky v každom čase odberu (označené ako F_T),

— testovacie banky pre výpočet hmotnostnej bilancie; minimálne dve banky pre každú koncentráciu testovanej látky (označené ako F_M),

— slepú kontrolu, bez testovanej látky; minimálne jedna čistá testovacia banka obsahujúca iba testovanú vodu (označené ako F_B),

— referenčnú kontrolu; dve paralelné banky s referenčnou látkou (napr. anilín alebo benzoát sodný s koncentráciou 10 µg/l) (označené ako F_C). Účelom referenčnej kontroly je potvrdiť minimálnu mikrobiálnu aktivitu. Ak je to vhodné, môže sa použiť radioaktívne označená referenčná látka aj vtedy, keď sa degradácia testovanej látky sleduje chemickou analýzou,

— sterilnú kontrolu; jedna alebo dve banky obsahujúce sterilizovanú testovanú vodu na preskúmanie prípadnej abiotickej degradácie alebo inej nebiologickej eliminácie testovanej látky (označené ako F_S). Biologickú aktivitu možno zastaviť autoklávovaním (121 °C; 20 min) testovanej vody alebo pridaním toxickej látky (napr. azid sodný (NaN_3) v množstve 10 – 20 g/l, chlorid ortuťnatý ($HgCl_2$) v množstve 100 mg/l alebo formalín v množstve 100 mg/l) alebo gamma žiarením. Ak sa použije $HgCl_2$, musí sa zneškodňovať ako toxický odpad. V prípade vody s veľkým množstvom pridaného sedimentu nie je jednoduché dosiahnuť sterilné podmienky; v takomto prípade sa odporúča opakované autoklávovanie (napr. trikrát). Je potrebné zohľadniť, že sa môžu počas autoklávovania zmeniť sorpčné vlastnosti sedimentu,

— kontroly rozpúšťadla obsahujúce testovanú vodu a testovanú vodu s referenčnou látkou; dve paralelné banky s rovnakým množstvom rozpúšťadla a s použitím rovnakého postupu, ako sa používa pri aplikácii testovanej látky. Účelom je preskúmať možné škodlivé účinky rozpúšťadla stanovením degradácie referenčnej látky.

Pri zostavovaní testu by výskumný pracovník mal zohľadniť relatívnu dôležitosť väčšieho počtu paraleliek v pokuse v porovnaní so zvýšeným počtom časov odberu. Presné číslo baniek bude závisieť od použitej metódy na stanovenie degradácie (pozri tretí odsek v oddiele 1.8.9.1, odsek 1.8.9.4 a dodatok 3).

▼M1

V každom čase odberu sa musia odobrať z každej testovanej banky dve čiastočné vzorky (napr. 5 ml alikvóty). Ak sa použije viac baniek, aby sa umožnilo zbieranie celých baniek, musia sa obetovať minimálne dve banky v každom čase odberu (pozri prvý odsek v oddiele 1.8.9.1).

1.8.9.3. *Príprava baniek na test suspendovaného sedimentu [voliteľné]*

Pridajte potrebné objemy testovanej vody a sedimentu, ak je potrebné, do testovacích nádob (pozri oddiel 1.8.5). Príprava baniek pre test suspendovaného sedimentu je rovnaká ako pre pelagický test (pozri oddiely 1.8.9.1 a 1.8.9.2). Použite prednostne sérové fľašky alebo banky podobného tvaru. Umiestnite uzatvorené banky na trepačku horizontálne. Otvorené banky pre neprchavé látky a neoznačené ^{14}C je potrebné umiestniť vo zvislej polohe; v tomto prípade sa odporúča magnetické miešanie s použitím magnetických miešadielok pokrytých sklom. V prípade potreby fľašky prevzdušnite, aby boli zachované správne aeróbne podmienky.

1.8.9.4. *Rádiochemické stanovenia*

Uvoľnený $^{14}CO_2$ sa stanovuje nepriamo a priamo (pozri dodatok 3). $^{14}CO_2$ sa stanovuje nepriamo na základe rozdielu medzi počiatočnou aktivitou ^{14}C v testovanej vode alebo suspenzii a celkovou zvyškovou aktivitou v čase odberu vzorky meranej po okyslení vzorky na pH 2 – 3 a odstránení CO_2. Anorganický uhlík sa tým odstráni a meraná zvyšková aktivita pochádza z organického materiálu. Nepriame stanovenie $^{14}CO_2$ sa nesmie použiť, ak počas transformácie testovanej látky vznikajú prchavé hlavné produkty transformácie (pozri dodatok 3). Ak je to možné, je potrebné merať uvoľnenie $^{14}CO_2$ priamo (pozri dodatok 3) v každom čase odberu vzoriek aspoň v jednej testovacej banke; tento postup umožňuje kontrolu hmotnostnej bilancie aj procesu biodegradácie, ale je obmedzený na testy uskutočnené s uzatvorenými bankami.

Ak sa stanovuje uvoľnený $^{14}CO_2$ priamo počas testu, musí sa na tento účel na začiatku testu pripraviť viac baniek. Odporúča sa priame stanovenie $^{14}CO_2$, ak počas transformácie testovanej látky vznikajú prchavé hlavné produkty transformácie. V každom bode merania sa okyslia ďalšie testovacie banky na pH 2 – 3 a $^{14}CO_2$ sa zhromaždí v internom alebo externom absorbéri (pozri dodatok 3).

Prípadne sa koncentrácie testovanej látky označenej ^{14}C a hlavné produkty transformácie môžu stanoviť s použitím rádiochromatografie (napr. chromatografia na tenkej vrstve, RAD-TLC) alebo HPLC s rádiochemickou detekciou.

Prípadne sa môže stanoviť fázové rozdelenie zvyškovej rádioaktivity (pozri dodatok 1) a zvyšnej testovanej látky a môžu sa stanoviť produkty transformácie.

▼M1

Na konci testu sa musí stanoviť hmotnostná bilancia priamym meraním $^{14}CO_2$ s použitím oddelených testovacích baniek, z ktorých sa počas testu neodoberú žiadne vzorky (pozri dodatok 3).

1.8.9.5. *Špecifická chemická analýza*

Ak je k dispozícii citlivá špecifická analytická metóda, primárna biodegradácia sa môže namiesto použitia techník rádioaktívneho označovania vyhodnotiť meraním celkovej zvyškovej koncentrácie testovanej látky. Ak sa používa rádioaktívne označená testovaná látka (na meranie celkovej mineralizácie), môže sa paralelne uskutočniť špecifická chemická analýza, aby poskytla ďalšie užitočné informácie, a na kontrolu postupu. Špecifická chemická analýza sa môže tiež použiť na meranie transformácie produktov, ktoré sa tvoria počas degradácie testovanej látky, a to sa odporúča pre látky, ktoré sa mineralizujú, s polčasmi viac ako 60 dní. Koncentrácia testovanej látky a produktov transformácie pri každom odbere sa stanoví a zaznamená (ako koncentrácia a ako percentuálny podiel použitého množstva). Vo všeobecnosti sa produkty transformácie stanovené pri ≥ 10 % použitej koncentrácie v ktoromkoľvek čase odberu vzoriek musia identifikovať, pokiaľ neexistuje iný riadne odôvodnený postup. Produkty transformácie, pre ktoré sa koncentrácie trvale zvyšujú počas štúdie, sa tiež posúdia na účely identifikácie, aj keď ich koncentrácie nepresahujú vyššie uvedené limity, lebo to môže byť dôkazom perzistencie. Je potrebné zvážiť analýzu produktov transformácie v sterilných kontrolkách, ak sa usudzuje, že by bola možná rýchla abiotická transformácia testovanej látky (napr. hydrolýza). Podľa jednotlivých prípadov je potrebné uvážiť potrebu kvantifikácie a identifikácie a v správe sa uvedú odôvodnenia. Extrakčné techniky s organickým rozpúšťadlom sa musia použiť podľa pokynov v príslušnom analytickom postupe.

Všetky vzorky sa musia skladovať pri 2 °C až 4 °C a bez prístupu vzduchu, ak sa analýza uskutoční do 24 hodín (prednostne). V prípade dlhšieho skladovania sa vzorky zmrazia pod – 18 °C alebo sa chemicky zakonzervujú. Acidifikácia ako metóda na konzerváciu vzoriek sa neodporúča, pretože acidifikované vzorky môžu byť nestabilné. Ak sa vzorky neanalyzujú do 24 hodín a skladujú sa dlhšie, je potrebné uskutočniť štúdiu stability počas skladovania, aby sa dokázala stabilita chemických látok, pri skladovaní pod – 18 °C alebo v podmienkach konzervácie. Ak analytická metóda obsahuje buď extrakciu rozpúšťadla, alebo extrakciu tuhej fázy (ETF), extrakcia sa musí uskutočniť hneď po odbere vzoriek alebo po uskladnení vzoriek v chladničke maximálne 24 hodín.

V závislosti od citlivosti analytickej metódy môžu byť potrebné väčšie objemy vzoriek, ako sú uvedené v odseku 16. Test sa môže jednoducho vykonať s jednolitrovými testovanými objemami v 2 – 3-litrových bankách, ktoré umožňujú odber približne 100 ml vzoriek.

▼M1

2. **ÚDAJE A SPRÁVY**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

2.1.1. **Grafické zaznamenanie údajov**

Zaokrúhlite časy odberu na celé hodiny (pokiaľ sa látka podstatne nedegraduje za niekoľko minút až hodín), ale nie na celé dni. Graficky zaznamenajte odhady zvyškovej aktivity testovanej látky (pre látky označené ^{14}C) alebo zvyškovú koncentráciu (pre neoznačené látky) proti času v lineárnom aj v semilogaritmickom grafe (pozri obrázky 1a, 1b). Ak prebieha degradácia, porovnajte výsledky z baniek F_T s výsledkami z baniek F_S. Ak sa stredné hodnoty výsledkov z baniek s testovanou látkou (F_T) a sterilných baniek (F_S) odchyľujú o menej ako 10 %, dá sa predpokladať, že pozorovaná degradácia je hlavne abiotická. Ak je degradácia v bankách F_S nižšia, môžu sa použiť čísla na korekciu čísel získaných z baniek F_T (odpočítaním) na odhad miery biodegradácie. Ak sa uskutočnia voliteľné analýzy pre hlavné produkty transformácie, je potrebné okrem grafu rozkladu testovanej látky poskytnúť grafy znázorňujúce ich tvorbu a rozklad.

Stanovte dĺžku lag fázy t_L z degradačnej krivky (semilogaritmický graf) extrapoláciou jej lineárnej časti na nulovú degradáciu alebo alternatívne stanovením času pre približne 10 % degradáciu (pozri obrázky 1a a 1b). Zo semilogaritmického grafu stanovte rýchlostnú konštantu prvého poriadku k a jej štandardnú chybu lineárnou regresiou ln (zvyškovej aktivity ^{14}C alebo koncentrácie testovanej látky) proti času. Pomocou predovšetkým meraní ^{14}C použite iba údaje prislúchajúce počiatočnej lineárnej časti krivky po ukončenej lag fáze a uprednostnite skôr výber menšieho množstva údajov, ktoré sú reprezentatívne, pred výberom väčšieho množstva nespoľahlivejších údajov. Nespoľahlivosť sa v tomto prípade týka chýb súvisiacich s odporúčaným priamym použitím nameraných zvyškových aktivít ^{14}C (pozri nižšie). Niekedy môže byť potrebné vypočítať dve odlišné rýchlostné konštanty, ak degradácia prebieha podľa bifázického modelu. Na tento účel sa definujú dve odlišné fázy degradačnej krivky. Pre každú jednu paralelnú banku sa musia urobiť výpočty rýchlostnej konštanty k a polčasu $t_{½} = ln2/k$, ak sa odoberajú čiastočné vzorky z rovnakej banky, alebo s použitím priemerných hodnôt, ak sa zužitkujú celé banky v každom čase odberu (pozri posledný odsek v oddiele 1.8.9.2). Ak sa použije prvý uvedený postup, je potrebné uviesť v správe rýchlostnú konštantu a polčas pre každú jednu paralelnú banku ako priemernú hodnotu so štandardnou chybou. Ak sa použili vysoké koncentrácie testovanej látky, degradačná krivka sa môže značne odchýliť od rovnej čiary (semilogaritmický graf) a kinetika prvého poriadku nemusí platiť. Preto nemá zmysel definovať polčas. V prípade obmedzeného rozsahu údajov sa však môže použiť kinetika pseudoprvého poriadku a stanoviť polčas degradácie DT_{50} (čas dosiahnutia 50 % degradácie). Je potrebné však pamätať na to, že časový priebeh degradácie mimo zvoleného rozsahu údajov sa nedá predpovedať s použitím DT_{50}, ktorý je iba deskriptorom daného súboru údajov. Analytické nástroje na uľahčenie štatistických výpočtov a na zostrojenie krivky sú ľahko dostupné a odporúča sa používať tento druh softvéru.

▼M1

Ak sa vykonáva špecifická chemická analýza, stanovte rýchlostné konštanty a polčasy pre primárnu degradáciu, ako je uvedené vyššie pre celkovú mineralizáciu. Ak primárna degradácia je ohraničeným procesom, môžu sa použiť experimentálne údaje z celého priebehu degradácie. Je to preto, že merania sú na rozdiel od meraní aktivity ^{14}C priame.

Ak sa použijú látky označené ^{14}C, aspoň na konci testu sa musí vyjadriť hmotnostná bilancia ako percento použitej začiatočnej koncentrácie.

2.1.2. **Zvyšková aktivita**

Ak sa biologicky degraduje časť organickej látky označená ^{14}C, hlavná časť ^{14}C sa premení na $^{14}CO_2$, zatiaľ čo ďalšia časť sa využije na rast biomasy a/alebo syntézu mimobunkových metabolitov. Z tohto dôvodu úplná „konečná“ biodegradácia látky nemá za následok 100 % konverziu uhlíka na $^{14}CO_2$. ^{14}C zabudovaný do produktov vytvorených biosyntézou sa následne pomaly uvoľňuje ako $^{14}CO_2$ pre „sekundárnu mineralizáciu“. Z týchto dôvodov sa v grafických znázorneniach zvyškovej organickej aktivity ^{14}C (meranej po uvoľnení CO_2) alebo $^{14}CO_2$ proti času po ukončení degradácie ukazuje „chvostovanie“. To sťažuje kinetickú interpretáciu údajov a z tohto dôvodu by sa na stanovenie degradačnej rýchlostnej konštanty mala obvykle použiť iba začiatočná časť krivky (po ukončení lag fázy a predtým, ako sa dosiahne približne 50 % degradácie). Ak sa degraduje testovaná látka, celková zvyšková aktivita organického ^{14}C je vždy vyššia ako aktivita ^{14}C spojená so zvyšnou intaktnou testovanou látkou. Ak sa testovaná látka degraduje reakciou prvého poriadku a konštantná časť α sa mineralizuje na CO_2, počiatočný sklon krivky úbytku ^{14}C (celkový organický ^{14}C proti času) bude α časy sklonu príslušnej krivky pre koncentráciu testovanej látky (alebo aby sme boli presní, časť testovanej látky označenej ^{14}C). Na základe meraní celkovej nekorigovanej aktivity organického ^{14}C bude preto vypočítaná degradačná rýchlostná konštanta konzervatívna. Postupy na stanovenie koncentrácií testovanej látky z nameraných rádiochemických aktivít, založené na rôznych zjednodušujúcich predpokladoch, sú uvedené v odkazoch (2) (9) (10) (11). Takéto postupy sa najjednoduchšie používajú pre rýchlo degradovateľné látky.

2.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Ak sa zistí, že k je nezávislá od pridanej koncentrácie (t. j. ak vypočítané k je približne rovnaké ako pri rôznych koncentráciách testovanej látky), dá sa predpokladať, že rýchlostná konštanta prvého poriadku je reprezentatívna pre použité testovacie podmienky, t. j. testovanú látku, vzorku vody a teplotu pri teste. To, do akej miery sa dajú výsledky zovšeobecniť alebo extrapolovať na iné systémy, sa musí odborne posúdiť. Ak sa použije vysoká koncentrácia testovanej látky a degradácia preto neprebieha podľa kinetiky prvého poriadku, údaje sa nedajú použiť na priame stanovenie rýchlostnej konštanty prvého poriadku alebo príslušný polčas. Údaje odvodené z testu s použitím vysokej koncentrácie testovanej látky sa môžu ešte stále použiť na stanovenie stupňa celkovej mineralizácie a/alebo na detekciu a kvantifikáciu produktov transformácie.

▼M1

Ak sú známe rýchlosti iných procesov úbytku ako biodegradácia (napr. hydrolýza alebo prchavosť), môžu sa odpočítať od čistej rýchlosti úbytku zistenej počas testu na stanovenie približného odhadu rýchlosti biodegradácie. Údaje pre hydrolýzu sa môžu získať napr. zo sterilnej kontroly alebo z paralelného testovania s použitím vyššej koncentrácie testovanej látky.

Nepriame a priame stanovenie $^{14}CO_2$ (oddiel 1.8.9.4 a dodatok 3) možno použiť iba na meranie miery mineralizácie testovanej látky na CO_2. Rádiochromatografia (RAD-TLC) alebo HPLC sa môžu použiť na analyzovanie koncentrácií testovanej látky označenej ^{14}C a vzniku hlavných produktov transformácie (tretí odsek v oddiele 1.8.9.4). Na umožnenie priameho stanovenia polčasu je potrebné, aby neboli prítomné žiadne hlavné produkty transformácie (definované ako ≥ 10 % použitého množstva testovanej látky). Ak sú prítomné hlavné produkty transformácie, ako sa tu definuje, je potrebné podrobné vyhodnotenie údajov. Toto môže zahŕňať opakované testovanie a/alebo identifikáciu produktov transformácie (pozri prvý odsek v oddiele 1.8.9.5), pokiaľ osud produktov transformácie nemožno logicky vyhodnotiť na základe skúseností (napr. informácie o ceste degradácie). Keďže sa pomer uhlíka testovanej látky premenenej na CO_2 mení (v závislosti zväčša od koncentrácie testovanej látky a iných dostupných substrátov, testovacích podmienok a mikrobiálneho spoločenstva), tento test neumožňuje priame stanovenie konečnej biodegradácie ako v DOC die-away teste, ale výsledok je podobný výsledku získanému respirometrickým testom. Stupeň mineralizácie bude teda nižší alebo rovnajúci sa minimálnej úrovni konečnej biodegradácie. Na získanie úplnejšieho obrazu konečnej biodegradácie (mineralizácie a zabudovania do biomasy) sa na konci testu musí vykonať analýza fázového rozdelenia ^{14}C (pozri dodatok 1). ^{14}C v podiele častíc bude pozostávať z ^{14}C zabudovaného do bakteriálnej biomasy a ^{14}C adsorbovaného na organické častice.

2.3. PLATNOSŤ TESTU

Ak sa referenčná látka nedegraduje v predpokladom časovom intervale (pre anilín a benzoát sodný obvykle menej ako dva týždne), platnosť testu je spochybnená a musí sa ďalej preveriť alebo sa alternatívne test musí zopakovať s novou vzorkou vody. V kruhovom teste ISO metódy, na ktorom sa zúčastnilo sedem laboratórií z Európy, prevzali degradačné rýchlostné konštanty pre anilín v rozmedzí 0,3 až 1,7 deň$^{-1}$ s priemerom 0,8 d^{-1} pri 20 °C a štandardnou chybou ± 0,4 d^{-1} ($t_{½}$ = 0,9 dňa). Typické lag fázy boli 1 až 7 dní. Uviedlo sa, že skúmané vody mali bakteriálnu biomasu zodpovedajúcu 10^3 -10^4 jednotkám tvoriacim kolónie (CFU) na ml. Degradačné rýchlosti v stredoeurópskych vodách bohatých na živiny boli vyššie ako v severských oligotrofických vodách, čo môže byť kvôli odlišnému trofickému stavu alebo prechádzajúcemu vystaveniu chemickým látkam.

Celková výťažnosť (hmotnostná bilancia) na konci pokusu musí byť medzi 90 % a 110 % pre radioaktívne označené látky, pričom počiatočná výťažnosť na začiatku pokusu musí byť medzi 70 % a 110 % pre neoznačené látky. Uvedené rozsahy je však potrebné interpretovať len ako ciele a nemali by sa používať ako kritériá pre akceptáciu testu.

▼M1

3. **SPRÁVA O TESTE**

Typ štúdie, t. j. pelagický alebo test suspendovaného sedimentu, sa musia jasne stanoviť v správe z testu, ktorá musí obsahovať minimálne tieto informácie:

Testovaná látka a referenčná látka(y):

— všeobecné názvy, chemické názvy (odporúčané názvy IUPAC a/alebo názvy CAS), čísla CAS, štrukturálne vzorce (uvádzajúce pozíciu označenia ^{14}C, ak sa používa rádioaktívne označená látka) a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti testu a referenčnej látky (pozri oddiely 1.5 a 1.6),

— všeobecné názvy, čísla CAS, štrukturálne vzorce (uvádzajúce pozíciu označenia ^{14}C, ak sa používa rádioaktívne označená látka) a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti látok použitých ako štandardy na identifikáciu produktov transformácie,

— čistota (nečistoty) testovaných a referenčných látok,

— rádiochemická čistota označenej chemickej látky a špecifická aktivita (v prípade potreby).

Povrchová voda:

Musia sa poskytnúť minimálne tieto informácie pre odobratú vzorku vody:

— umiestnenie a opis miesta odberu vzoriek vrátane predchádzajúcej kontaminácie, ak je to možné,

— dátum a miesto odberu vzoriek,

— živiny (celkový N, amónne ióny, dusitany, dusičnany, celkový P, rozpustené ortofosfáty),

— hĺbka odberu,

— vzhľad vzorky (napr. farba a zákal),

— DOC a TOC,

— BSK,

— teplota a pH v mieste a čase odberu,

— kyslík alebo redoxný potenciál (povinné iba vtedy, ak nie sú zrejmé aeróbne podmienky),

— slanosť alebo vodivosť (v prípade morskej vody a poloslanej vody),

— suspendované tuhé látky (v prípade zakalenej vzorky),

— prípadne ďalšie informácie o mieste odberu v čase odberu (napr. aktuálne alebo predchádzajúce údaje o rýchlosti toku riek alebo morských prúdov, hlavné vypúšťania v blízkosti a typ vypúšťaní, poveternostné podmienky pred časom odberu)

a prípadne:

— mikrobiálna biomasa (napr. priame stanovenie metódou farbenia akridínovou oranžovou alebo jednotky tvoriace kolónie),

▼M1

— anorganický uhlík,

— koncentrácia chlorofylu-a ako špecifické stanovenie biomasy rias.

Okrem toho sa poskytnú tieto informácie o sedimente, ak sa uskutočňuje test suspendovaného sedimentu:

— hĺbka odberu sedimentu,

— vzhľad sedimentu (napr. sfarbený, bahnitý, prachový alebo pieskový),

— textúra (napr. % hrubého piesku, jemného piesku, siltu a ílu),

— sušina v g/l suspendovaných tuhých látok, koncentrácia TOC alebo úbytok hmotnosti žíhaním ako kritérium obsahu organickej látky,

— pH,

— kyslík alebo redoxný potenciál (povinné iba, ak nie sú zrejmé aeróbne podmienky).

Testovacie podmienky:

— čas medzi odberom a s použitím v laboratórnom teste, skladovanie vzoriek a predpríprava vzorky, dátumy uskutočnenia štúdií,

— množstvo použitej testovanej látky, testovaná koncentrácia a referenčná látka,

— metóda aplikácie testovanej látky vrátane každého použitia rozpúšťadiel,

— objem použitej povrchovej vody a sedimentu (ak sa používa) a odobratý objem v každom intervale na analýzu,

— opis použitého testovacieho systému,

ak sa nemôžu dodržať podmienky uchovávania v tme, informácie o podmienkach „difúzneho svetla“,

— informácie o metóde(-ach) použitých na zabezpečenie sterilných podmienok (napr. teplota, čas a počet autoklávovaní),

— inkubačná teplota,

— informácie o analytických technikách a metóde(-ach) použitých na rádiochemické merania a na kontrolu hmotnostnej bilancie a stanovenia fázového rozdelenia (ak sa vykonáva),

— počet paraleliek.

Výsledky:

— výťažnosť v percentách (pozri oddiel 1.7.1),

— opakovateľnosť a citlivosť použitých analytických metód vrátane detekčného limitu (LOD) a limitu kvantifikácie (LOQ) (pozri oddiel 1.7.2),

▼M1

— všetky namerané údaje (vrátane časov odberu) a vypočítané hodnoty v tabuľkovej forme a degradačné krivky pre každú testovanú koncentráciu a pre každú paralelnú banku; zaznamenajte lineárny korelačný koeficient pre sklon logaritmického grafu, stanovenú lag fázu a rýchlostnú konštantu prvého poriadku alebo pseudoprvého poriadku (ak je to možné) a príslušný polčas degradácie (alebo polčas, t_{50}),

— zaznamenajte príslušné hodnoty ako priemery výsledkov zistených v jednotlivých paralelkách, napr. dĺžku lag fázy, degradačnú rýchlostnú konštantu a polčas degradácie (alebo t_{50}),

— kategorizujte systém ako neadaptovaný alebo adaptovaný na základe vzhľadu degradačnej krivky a prípadného vplyvu testovanej koncentrácie,

— výsledky konečnej kontroly hmotnostnej bilancie a výsledky stanovení fázového rozdelenia (ak sa uskutočnili),

— frakcia mineralizovaného ^{14}C a v prípade použitia špecifickej analýzy konečná úroveň primárnej degradácie,

— identifikácia, molárna koncentrácia a percento použitých a hlavných produktov transformácie (pozri prvý odsek v oddiele 1.8.9.5) v prípade potreby,

— navrhovaná cesta transformácie v prípade potreby,

— diskusia o výsledkoch.

4. **POUŽITÁ LITERATÚRA**

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water – Simulation Biodegradation Test.

2. ISO/DIS 14592 – 1 (1999) Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

3. Testing Method C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.

4. Testing Method C.24. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediments.

5. OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

6. ISO 8245 (1999). Water quality – Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

7. ISO 10634 (1995). Water quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

8. OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22 (to be published summer 2000).

▼**M1**

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394 – 401.

10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274 – 283.

11. ISO/CD 14592 – 1 (1999). Ring test report: Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 – report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

▼M1

Dodatok 1

Fázové rozdelenie ^{14}C

Na kontrolu postupu sa musí bežné stanovenie celkovej zvyškovej organickej aktivity ^{14}C (TOA) doplniť meraniami hmotnostnej bilancie zahŕňajúcej priame stanovenie uvoľneného $^{14}CO_2$ po zachytení na absorbéri (pozri dodatok 3). Pozitívny vznik $^{14}CO_2$ je sám osebe priamym dôkazom biodegradácie na rozdiel od abiotickej degradácie alebo iných mechanizmov úbytku, ako napr. prchavosť a sorpcia. Ďalšie užitočné informácie charakterizujúce priebeh biodegradovateľnosti možno získať z meraní distribúcie TOA medzi rozpusteným stavom (aktivita rozpusteného organického ^{14}C, DOA) a časticovým stavom (časticová aktivita organického ^{14}C, POA) po oddelení častíc membránovou filtráciou alebo odstredením. POA pozostáva z testovanej látky naadsorbovanej na mikrobiálnu biomasu a na iné častice testovanej látky okrem uhlíka, ktorý sa použil na syntézu nového bunkového materiálu a tak zabudoval do časticovej frakcie biomasy. Vznik rozpusteného ^{14}C organického materiálu sa dá stanoviť ako DOA na konci biodegradácie (plató na krivke degradácie proti času).

Stanovenie fázového rozdelenia zvyškového ^{14}C vo vybratých vzorkách filtrovaním vzoriek na 0,22 μm alebo 0,45 μm membránovom filtri z materiálu, ktorý neadsorbuje významné množstvá testovanej látky (môžu byť vhodné polykarbonátové filtre). Ak je adsorpcia testovanej látky na filter príliš veľká na to, aby sa nemusela zohľadniť (je to potrebné skontrolovať pred pokusom), môže sa použiť namiesto filtrácie centrifugácia pri vysokej rýchlosti (2 000 g; 10 min.).

Pokračujte s filtrátom alebo s odstredenou zložkou, ako je uvedené v dodatku 3 pre nefiltrované vzorky. Rozpustite membránové filtre vo vhodnej scintilačnej kvapaline a merajte ako obvykle, bežne len pomerovou metódou s externým štandardom na korekciu zhášania, alebo použite okysličovadlo vzoriek. Ak sa použila centrifugácia, resuspendujte pelet vzniknutý z frakcie častíc v 1 – 2 ml destilovanej vody a preneste do scintilačnej fľaštičky. Potom s použitím 1 ml destilovanej vody dvakrát premyte a preneste premývaciu vodu do fľaštičky. V prípade potreby sa suspenzia môže zaliať do gélu na meranie kvapalinovým scintilačným počítačom.

▼M1

Dodatok 2

PoloKontinuálny postup

Môže byť potrebné predĺžiť inkubáciu na niekoľko mesiacov na dosiahnutie dostatočnej degradácie látok, ktoré sa ťažko odbúravajú. Dĺžka testu nesmie byť obvykle dlhšia ako 60 dní, pokiaľ nie sú zachované vlastnosti pôvodnej vzorky vody obnovením testovanej suspenzie. Čas testu sa však môže predĺžiť maximálne na 90 dní bez obnovenia testovanej suspenzie, ak sa degradácia testovanej látky začala počas prvých 60 dní.

Počas dlhodobej inkubácie sa diverzita mikrobiálneho spoločenstva môže obmedziť kvôli mechanizmom úbytku a kvôli prípadnému úbytku základných živín a primárnych uhlíkových substrátov vo vzorke vody. Preto sa odporúča, aby sa použil semikontinuálny test na príslušné stanovenie rýchlosti degradácie látok, ktoré sa pomaly degradujú. Test je potrebné začať s použitím semikontinuálneho postupu, ak sa na základe predchádzajúcich skúseností predpokladá, že na dosiahnutie 20 % degradácie látky bude potrebný inkubačný čas tri mesiace. Alternatívne sa môže bežný dávkový test zmeniť na semikontinuálny test, ak sa nedosiahne žiadna degradácia testovanej látky počas približne 60 dní testovania s použitím dávkového postupu. Semikontinuálny postup sa môže zastaviť a test pokračuje ako dávkový pokus, keď sa zaznamená významná degradácia (napr. > 20 %).

V polokontinuálnom teste sa každé dva týždne nahradí približne jedna tretina objemu testovanej suspenzie čerstvo odobratou vodou s testovanou látkou, ktorá sa pridá do počiatočnej koncentrácie. Ak sa vykonáva test suspendovaného sedimentu, podobne sa do vody pridá sediment na nahradenie do počiatočnej koncentrácie (medzi 0,01 a 1 g/l). Pri uskutočňovaní testu so suspendovanými tuhými látkami je dôležité, aby sa zachoval plne suspendovaný systém aj počas obnovenia vody a aby bol rezidenčný čas rovnaký pre tuhé látky a vodu, lebo v opačnom prípade sa môže stratiť plánovaná podobnosť s homogénnym vodným systémom bez ustálených fáz. Z týchto dôvodov sa uprednostňuje počiatočná koncentrácia suspendovaných sedimentov v spodnom rozsahu špecifikovaného intervalu, ak sa používa semikontinuálny postup.

Predpísané pridanie testovanej látky znamená, že sa počiatočná koncentrácia testovanej látky čiastočným obnovením testovanej suspenzie neprekročí, a teda sa zabráni adaptácii, ktorá sa často pozoruje pri vysokých koncentráciách testovanej látky. Keďže postup zahŕňa reinokuláciu aj nahradenie vyčerpaných živín a primárnych substrátov, pôvodná mikrobiálna diverzita sa obnoví a trvanie testu sa môže v podstate predlžovať až do nekonečna. Ak sa používa semikontinuálny postup, je dôležité pripomenúť, že sa zvyšková koncentrácia testovanej látky musí korigovať o množstvá pridanej a odstránenej testovanej látky pri každom obnovení. Pre látky, ktoré sa zle adsorbujú, sa môže používať celková koncentrácia alebo koncentrácia rozpustenej testovanej látky. Adsorpcia je minimálna (< 5 %) za špecifických podmienok (0,1 – 1 g tuhých látok/l) pre látky s log Kow < 3 (platí pre neutrálne, lipofilné zlúčeniny). Toto je vyjadrené v nasledujúcom príklade výpočtu: 0,1 g/l tuhých látok približne zodpovedá 10 mg uhlíka na liter (frakcia uhlíka, f_C = 0,01). Za predpokladu, že

Log K_{ow} (testovanej látky) = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

rozdeľovací koeficient, $K_d = f_C \times K_{oc}$,

potom rozpustená frakcia celkovej koncentrácie (C-voda (C_w)/C-celková (C_t) je:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Dodatok 3

Stanovenie $^{14}CO_2$

Nepriame stanovenie $^{14}CO_2$

Pre bežné merania je nepriama metóda obvykle najmenej časovo náročnou a najpresnejšou metódou, ak je testovaná látka neprchavá a netransformuje sa na prchavé produkty transformácie. Preneste jednoducho nefiltrované vzorky, napr. veľkosti 5 ml, do scintilačných fľaštičiek. Na začiatku je vhodná aktivita vo vzorkách 5 000 dpm – 10 000 dpm (80 – 170 Bq) a minimálna počiatočná aktivita je okolo 1 000 dpm. CO_2 sa musí odstrániť po okyslení na pH 2 – 3 1 – 2 kvapkami koncentrovanej H_3PO_4 alebo HCl. Odstránenie CO_2 možno uskutočniť prebublávaním vzduchom počas približne ½ – 1 hodiny. Alternatívne sa môžu fľaštičky prudko trepať 1 – 2 hodiny (napríklad na mikrotrepačke) alebo za miernejšieho trepania cez noc. Účinnosť postupu odstraňovania CO_2 sa musí skontrolovať (predĺžením času prevzdušňovania alebo trepania). Potom sa musí pridať scintilačná kvapalina vhodná na meranie vodných vzoriek, vzorka sa homogenizuje vo vírivom mixéri a rádioaktivita sa stanoví meraním kvapalinovým scintilačným počítačom a odpočítaním aktivity pozadia zistenej v slepých vzorkách (F_B). Pokiaľ nie je testovaná voda príliš sfarbená alebo neobsahuje vysokú koncentráciu častíc, vykazujú vzorky obvykle rovnaké zhášanie a bude postačujúce uskutočniť korekcie zhášania s použitím externého štandardu. Ak je testovaná voda veľmi sfarbená, môže byť potrebná korekcia zhášania pridaním vnútorného štandardu. Ak je vysoká koncentrácia častíc, nemusí sa dať dosiahnuť homogénny roztok alebo gél alebo môžu sa vyskytnúť veľké odchýlky medzi vzorkami v zhášaní. V tomto prípade sa môže použiť metóda merania opísaná nižšie pre testované suspenzie. Ak sa test vykonáva ako test suspendovaného sedimentu, meranie $^{14}CO_2$ by sa mohlo uskutočniť nepriamo odobratím homogénnej 10 ml vzorky testovanej vody/suspenzie a oddelením fáz centrifugáciou pri vhodnej rýchlosti (napr. 15 min. pri 40 000 m/s^2). Vodná fáza sa potom spracuje, ako je uvedené vyššie. Aktivita ^{14}C vo fáze častíc (POA) sa stanoví resuspendovaním sedimentu do malého objemu destilovanej vody, prenosom do scintilačných fľaštičiek a pridaním scintilačnej kvapaliny na vytvorenie gélu (na tento účel sú dostupné špeciálne scintilačné kvapaliny). V závislosti od charakteru častíc (napr. aký majú obsah organického materiálu), môže byť vhodné natráviť vzorku cez noc solubilizérom tkanív a potom pred pridaním scintilačnej kvapaliny homogenizovať vo vírivom mixéri. Alternatívne sa môže stanoviť POA spaľovaním v nadbytku kyslíka s použitím okysličovadla vzoriek. Pri meraní sa musia vždy pridať vnútorné štandardy a môže byť potrebné uskutočniť korekcie zhášania pridaním vnútorného štandardu pre každú jednu vzorku.

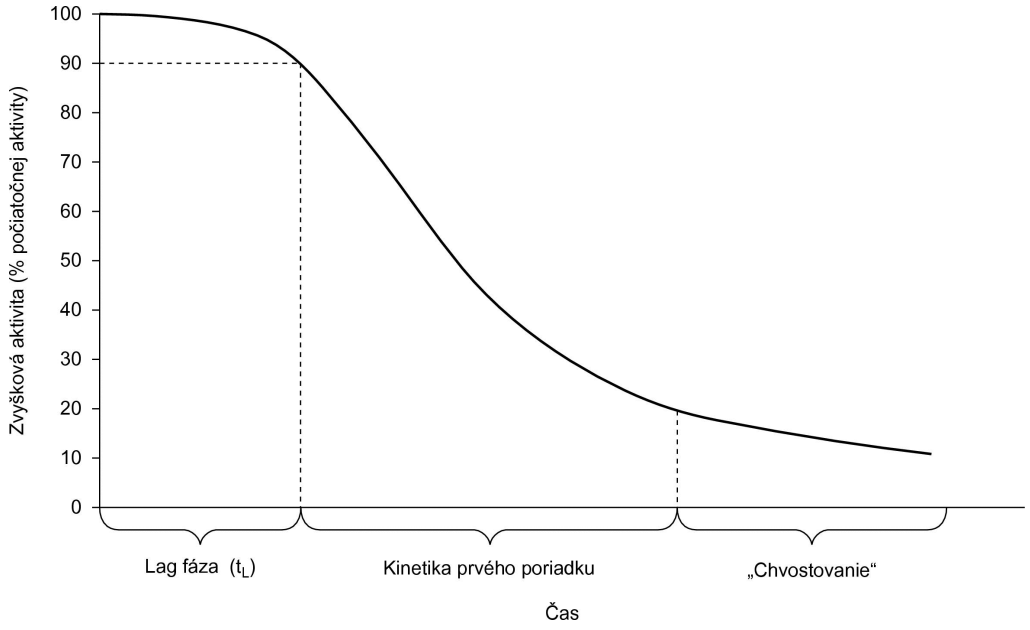
Priame stanovenie $^{14}CO_2$

Na priame stanovenie uvoľneného $^{14}CO_2$ sa na začiatku testu pripraví viac baniek, zužitkovanie testovacích baniek sa v každom bode stanovenia vykoná tak, že sa testovacie banky okyslia na pH 2 – 3 a $^{14}CO_2$ sa zhromaždí vo vnútornom (umiestnenom v každej testovacej banke na začiatku testu) alebo externom absorbéri. Ako absorbčné médium sa môže použiť buď alkalická zásada (napr. 1 N roztok NaOH alebo granule NaOH), etanolamín alebo komerčne dostupné absorbéry založené na etanolamíne. Na priame stanovenie $^{14}CO_2$ musia byť banky uzatvorené, napr. butylkaučukovou zátkou.

▼**M1**

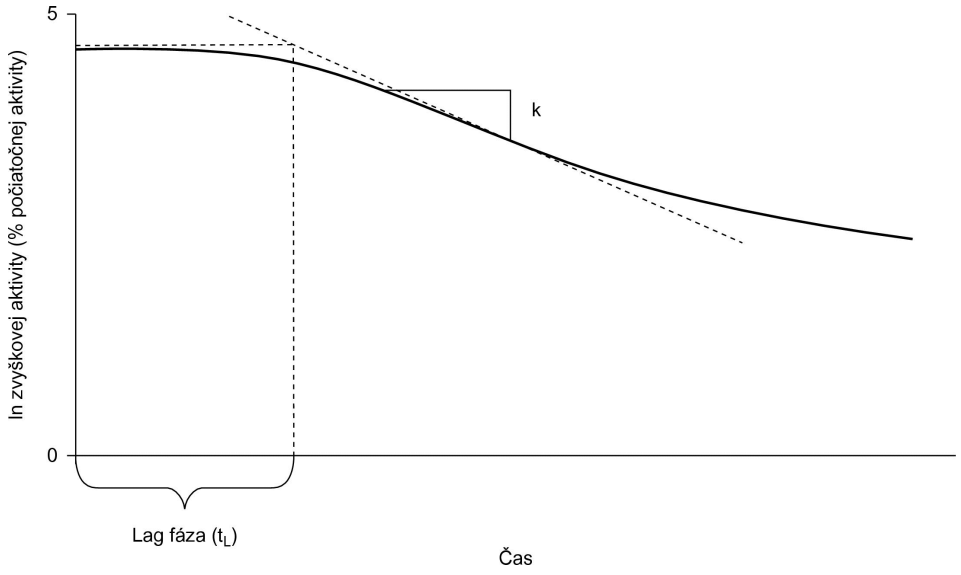
Obrázok 1a

Príklad aritmetického grafického zaznamenania údajov (zvyšková aktivita proti času)



Obrázok 1b

Vzor semilogaritmického grafického zaznamenania údajov (ln zvyškovej aktivity proti času)



▼M6

C.26. DRUHY RODU *LEMNA*, TEST INHIBÍCIE RASTU

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 221 (2006). Určená je na hodnotenie toxicity chemikálií pre sladkovodné rastliny rodu *Lemna* (žaburinka). Založená je na existujúcich metódach uvedených v literatúre pod číslami (1) (2) (3) (4) (5) (6), obsahuje však modifikácie týchto metód zohľadňujúce najnovší výskum a konzultácie týkajúce sa niekoľkých kľúčových aspektov. Táto testovacia metóda bola validovaná medzinárodnou porovnávacou skúškou (7).

2. Táto testovacia metóda opisuje testovanie toxicity pri použití druhov *Lemna gibba* a *Lemna minor*, ktoré sú podrobené rozsiahlym štúdiám a podliehajú uvedeným normám. Taxonómia rodu *Lemna* je zložitá, komplikuje ju výskyt veľkého množstva fenotypov. Aj keď sa v prípade rodu *Lemna* môže vyskytnúť genetická variabilita pri reakcii na toxické látky, v súčasnosti neexistujú dostatočné údaje o tomto zdroji variability tak, aby sa mohol odporučiť konkrétny klon na použitie v rámci tejto testovacej metódy. Je potrebné si uvedomiť, že test sa nevykonáva axenicky, ale jednotlivé kroky počas postupu testu sa vykonávajú v etapách, aby sa minimalizovala kontaminácia inými organizmami.

3. Uvádzajú sa informácie o testovaní pri obnove (semistatické a prietokové) a bez obnovy (statické) testovacieho roztoku. V závislosti od cieľov testu a od regulačných požiadaviek sa odporúča zvážiť použitie semistatických a prietokových metód, napríklad pre chemikálie, ktoré z roztoku rýchlo unikajú v dôsledku odparovania, fotodegradácie, precipitácie alebo biodegradácie. Ďalšie informácie sú uvedené v literatúre pod číslom (8).

4. Vymedzenie použitých pojmov je uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

5. Umožní sa exponenciálny rast rastlinných kultúr rodu *Lemna* vo forme monokultúr v odlišných koncentráciách testovanej chemikálie počas siedmich dní. Cieľom testu je kvantifikovať účinky chemikálie na vegetatívny rast v uvedenom čase na základe hodnotenia zvolených meraných premenných. Najdôležitejšou meranou premennou je počet lístkov. Meria sa ešte aspoň jedna ďalšia premenná (celková plocha lístkov, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave), keďže niektoré chemikálie môžu oveľa viac ovplyvniť iné merané premenné ako počet lístkov. Na kvantifikovanie účinkov chemikálie sa rast v testovacích roztokoch porovnáva s rastom v kontrolných vzorkách a stanoví sa koncentrácia spôsobujúca špecifickú x % inhibíciu rastu (napr. 50 %) a vyjadrí sa ako EC_x (napr. EC_{50}).

6. Konečným bodom testu je inhibícia rastu vyjadrená ako logaritmický nárast meranej premennej (priemerná špecifická rýchlosť rastu) počas expozície. Z priemerných hodnôt špecifickej rýchlosti rastu zaznamenaných v sérii testovacích roztokov sa stanoví koncentrácia, ktorá spôsobuje špecifickú x % inhibíciu rýchlosti rastu (napr. 50 %), a vyjadrí sa ako E_rC_x (napr. E_rC_{50}).

7. Ďalšou premennou hodnotou reakcie použitou v tejto testovacej metóde je výťažok, ktorý sa v niektorých krajinách môže vyžadovať na splnenie špecifických regulačných požiadaviek. Vymedzený je ako rozdiel hodnoty meraných premenných na konci expozície a hodnoty meraných premenných na jej začiatku. Z výťažku zaznamenaného v sérii testovacích roztokov sa vypočíta koncentrácia, ktorá spôsobuje špecifickú x % inhibíciu výťažku (napr. 50 %), a vyjadrí sa ako E_yC_x (napr. E_yC_{50}).

▼M6

8. Okrem toho je možné štatisticky stanoviť najnižšiu koncentráciu s pozorovaným účinkom (LOEC), ako aj koncentráciu bez pozorovaného účinku (NOEC).

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

9. Na kvantifikáciu chemikálie v testovacom médiu by mala byť k dispozícii analytická metóda s vhodnou citlivosťou.

10. Informácie o testovanej chemikálii, ktoré môžu byť užitočné pri stanovovaní testovacích podmienok, zahŕňajú štrukturálny vzorec, čistotu, rozpustnosť vo vode, stabilitu vo vode a svetle, pK_a, K_{ow}, tlak pary a biodegradovateľnosť. Rozpustnosť vo vode a tlak pary je možné použiť na výpočet Henryho konštanty, ktorá bude indikovať, či môže dôjsť k značným úbytkom testovanej chemikálie počas testu. To pomôže pri indikácii, či je potrebné prijať konkrétne kroky na kontrolu takýchto úbytkov. Ak sú informácie o rozpustnosti a stabilite testovanej chemikálie neurčité, odporúča sa, aby sa tieto informácie hodnotili za podmienok testu, t. j. s rastovým médiom, teplotou, režimom osvetľovania používanými v teste.

11. Ak je kontrola pH testovacieho média obzvlášť dôležitá, napríklad pri testovaní kovov alebo chemikálií, ktoré sú hydrolyticky nestabilné, odporúča sa pridať do rastového média tlmivý roztok (pozri bod 21). Ďalšie informácie týkajúce sa testovaných chemikálií s fyzikálno-chemickými vlastnosťami, ktoré sťažujú ich testovanie, sú uvedené v literatúre pod číslom (8).

PLATNOSŤ TESTU

12. Tento test je platný, iba ak čas zdvojnásobenia počtu lístkov v kontrolnej vzorke je menej ako 2,5 dňa (60 hod.), čo zodpovedá približne sedemnásobnému zvýšeniu za sedem dní a priemernej špecifickej rýchlosti rastu 0,275 $deň^{-1}$. Pri použití média a za podmienok testu uvedených v tejto testovacej metóde sa toto kritérium môže splniť, ak sa použije statický test (5). Rovnako sa predpokladá, že toto kritérium bude možné dosiahnuť aj za podmienok semistatického a prietokového testu. Výpočet času zdvojenia je uvedený v bode 49.

REFERENČNÁ CHEMIKÁLIA

13. Referenčné chemikália, resp. chemikálie, ako napríklad 3,5-dichlórfenol, používané v medzinárodnej porovnávacej skúške (7) sa môžu testovať ako prostriedok kontroly postupu testu. Odporúča sa testovať referenčnú chemikáliu najmenej dvakrát do roka, alebo ak sa testovanie vykonáva zriedkavejšie, súbežne so stanovením toxicity testovanej chemikálie.

OPIS METÓDY

Zariadenie

14. Všetky zariadenia, ktoré prichádzajú do styku s testovacím médiom, by mali byť vyrobené zo skla alebo iného chemicky inertného materiálu. Sklené nádoby používané na kultiváciu a na testovanie by sa mali vyčistiť od chemických kontaminantov, ktoré by sa mohli rozpúšťať v testovacom médiu, a mali by byť sterilné. Testovacie nádoby by mali byť dostatočne široké, aby lístky rôznych kolónií v kontrolných nádobách mohli rásť bez toho, aby sa na konci testu prekrývali. Neprekáža, ak sa korienky dotýkajú dna testovacích nádob, ale odporúča sa minimálna hĺbka 20 mm a minimálny objem 100 ml v každej testovacej nádobe. Výber testovacích nádob nie je rozhodujúci, pokiaľ sa tieto požiadavky dodržia. Vhodné sú všetky druhy sklených kadičiek, kryštalizačných misiek alebo sklených Petriho misiek

▼M6

primeraných rozmerov. Testovacie nádoby musia byť zakryté, aby sa minimalizovalo vyparovanie a náhodná kontaminácia, pričom sa musí umožniť potrebná výmena vzduchu. Vhodné testovacie nádoby, a predovšetkým veká, nesmú spôsobovať tienenie alebo zmeny spektrálnych charakteristík svetla.

15. Kultúry a testovacie nádoby by sa nemali uchovávať spoločne. To je možné najlepšie dosiahnuť použitím oddelených environmentálnych rastových komôr, inkubátorov alebo miestností. Osvetlenie a teplota musia byť nastavovateľné a udržiavané na konštantnej úrovni (pozri body 35 a 36).

Testované organizmy

16. Organizmus používaný pre tento test je buď *Lemna gibba*, alebo *Lemna minor*. Krátka charakteristika druhov žaburinky, ktoré sa používajú na testovanie toxicity, je uvedená v dodatku 2. Rastlinný materiál je možné získať zo zbierky kultúr, z iného laboratória alebo z terénu. Ak je získaný z terénu, je potrebné minimálne osem týždňov pred použitím uchovávať rastliny v kultúre v rovnakom médiu, aké sa používa na testovanie. Miesta v teréne použité na zbieranie počiatočných kultúr musia byť bez zrejmých zdrojov kontaminácie. Ak sa materiál získa z iného laboratória alebo zo zbierky kultúr, mal by sa takisto uchovávať minimálne tri týždne. Vždy je potrebné uviesť v správe zdroj rastlinného materiálu a druh a klon (ak je známy) použitý na testovanie.

17. Používať by sa mali monokultúry, ktoré sú viditeľne bez kontaminácie inými organizmami, ako sú napríklad riasy a prvoky. dravé rastliny *L. minor* sa skladajú z kolónií obsahujúcich dva až päť lístkov, kým zdravé kolónie *L. gibba* môžu obsahovať až sedem lístkov.

18. Kvalita a uniformita rastlín, ktoré sa používajú na test, budú mať značný vplyv na výsledok testu, a preto by sa mali starostlivo vyberať. Použiť by sa mali mladé, rýchlo rastúce rastliny bez viditeľných lézií alebo úbytku farby (chloróza). Kvalitné kultúry sa prejavujú vysokým výskytom kolónií, ktoré pozostávajú najmenej z dvoch lístkov. Veľký počet jediných lístkov značí environmentálny stres, napríklad obmedzený prísun živín, preto by sa rastlinný materiál z takýchto kultúr nemal použiť na testovanie.

Kultivácia

19. Na zníženie frekvencie uchovávania kultúr (napr. v čase, keď sa neplánujú žiadne testy s rodom *Lemna*) sa kultúry môžu uchovávať pri zníženom osvetlení a teplote (4 – 10 °C). Informácie o kultivovaní sú uvedené v dodatku 3. Zrejmé znaky kontaminácie riasami alebo inými organizmami si môžu vyžadovať povrchovú sterilizáciu čiastočnej vzorky lístkov rastlín rodu *Lemna*, ktorá sa potom prenesie do čerstvého média (pozri dodatok 3). V tomto prípade by sa zvyšná kontaminovaná kultúra mala vyradiť.

20. Najmenej sedem dní pred vykonaním testu sa dostatočný počet kolónií prenesie sterilne do čerstvého sterilného média a kultivuje 7 – 10 dní za podmienok testu.

Testovacie médium

21. Pre druhy *Lemna minor* a *Lemna gibba* sa odporúčajú rôzne médiá, ako je uvedené nižšie. Je potrebné starostlivo posúdiť pridanie pH tlmivého roztoku do testovacieho média [MOPS (kyselina 4-morfolinopropánsulfónová, číslo CAS: 1132–61–2) v médiu pre *L. minor* a $NaHCO_3$ v médiu pre *L. gibba*], ak sa očakáva, že by mohol reagovať s testovanou chemikáliou a ovplyvniť vyjadrenie jej toxicity. Steinbergovo médium (9) je tiež prijateľné, pokiaľ sú splnené kritériá platnosti.

▼M6

22. Na kultiváciu a testovanie druhu *L. minor* sa odporúča modifikácia švédskej normy (SIS) rastového média pre rod *Lemna*. Zloženie tohto média je uvedené v dodatku 4.

23. Na kultiváciu a testovanie druhu *L. gibba* sa odporúča rastové médium 20X – AAP, ako je uvedené v dodatku 4.

24. Steinbergovo médium, ako je uvedené v dodatku 4, je takisto vhodné pre druh *L. minor*, no môže sa použiť aj pre druh *L. gibba*, pokiaľ sú splnené kritériá platnosti.

Testovacie roztoky

25. Testovacie roztoky sa pripravujú obvykle zriedením zásobného roztoku. Zásobné roztoky testovanej chemikálie sa spravidla pripravujú rozpustením látky v rastovom médiu.

26. Najvyššia testovacia koncentrácia testovanej chemikálie by spravidla nemala byť vyššia ako rozpustnosť látky vo vode za podmienok testu. Je však potrebné si uvedomiť, že rastliny rodu *Lemna* plávajú na povrchu a môžu byť vystavené chemikáliám, ktoré sa zhromažďujú na rozhraní voda – vzduch (napr. látky, ktoré sú vo vode zle rozpustné, hydrofóbne látky alebo povrchovo aktívne látky). Za takýchto podmienok bude expozícia pochádzať z iného materiálu, než sa nachádza v roztoku, a testovacie koncentrácie môžu byť v závislosti od vlastností testovanej chemikálie vyššie ako rozpustnosť vo vode. Pre testované chemikálie s nízkou rozpustnosťou vo vode môže byť potrebné pripraviť koncentrovaný zásobný roztok alebo disperziu chemikálie s použitím organického rozpúšťadla alebo disperzantu, aby sa umožnilo pridanie presných množstiev testovanej chemikálie do testovacieho média a napomohlo jej rozptýlenie a rozpustenie. Treba vyvinúť maximálne úsilie na to, aby sa zabránilo použitiu takýchto materiálov. Nemala by sa vyskytovať žiadna fytotoxicita v dôsledku použitia pomocných rozpúšťadiel alebo disperzantov. Napríklad k bežne používaným rozpúšťadlám, ktoré nespôsobujú fytotoxicitu pri koncentráciách do 100 µl/l, patrí acetón a dimetylformamid. Ak sa používa rozpúšťadlo alebo disperzant, jeho konečná koncentrácia by sa mala zaznamenať a udržiavať na minime ($\leq$ 100 µl/l) a všetky vzorky s aplikovanou chemikáliou a kontrolné vzorky by mali obsahovať rovnakú koncentráciu rozpúšťadla alebo disperzantu. Ďalšie informácie o použití disperzantov sú uvedené v literatúre pod číslom (8).

Testovacie a kontrolné skupiny

27. Predchádzajúce poznatky o toxicite testovanej chemikálie pre rod *Lemna*, napríklad z testov na vyhľadávanie rozsahu, pomôžu pri voľbe vhodných testovaných koncentrácií. V konečnom teste toxicity by spravidla malo byť najmenej päť testovaných koncentrácií zoradených v geometrických radoch. Rozdeľovacia konštanta medzi testovanými koncentráciami by prednostne nemala byť viac ako 3,2, no môže sa použiť aj vyššia hodnota, ak je krivka závislosti veličiny od koncentrácie plochá. Je potrebné uviesť zdôvodnenie, ak sa použije menej ako päť koncentrácií. Na každú testovanú koncentráciu by sa mali použiť najmenej tri replikáty.

28. Pri stanovení rozsahu testovaných koncentrácií (v prípade testu na vyhľadávanie rozsahu a/alebo konečného testu toxicity) je potrebné zvážiť tieto okolnosti:

— Na stanovenie koncentrácie EC_x musia testované koncentrácie podopierať hodnotu EC_x tak, aby sa zabezpečila primeraná úroveň spoľahlivosti. Napríklad ak sa odhaduje koncentrácia EC_{50}, najvyššia testovaná koncentrácia musí byť vyššia ako hodnota EC_{50}. Ak je hodnota EC_{50} mimo rozsahu testovaných koncentrácií, príslušné intervaly spoľahlivosti budú veľké a môže sa stať, že nebude možné správne posúdiť vhodnosť modelu pre štatistické spracovanie.

— Ak je cieľom odhad koncentrácií LOEC/NOEC, najnižšia testovaná koncentrácia by mala byť dostatočne nízka na to, aby rast nebol významne nižší než v kontrolnej vzorke. Okrem toho najvyššia testovaná

▼M6

koncentrácia by mala byť dostatočne vysoká na to, aby bol rast významne nižší než v kontrolnej vzorke. Ak to tak nie je, test sa bude musieť opakovať s použitím iného koncentračného rozsahu (pokiaľ najvyššia koncentrácia nie je medzou rozpustnosti alebo najvyššou povolenou limitnou hodnotou koncentrácie, napríklad 100 mg/l).

29. Každý test by mal zahŕňať kontrolné vzorky pozostávajúce z rovnakého média obsahujúceho živiny, počtu lístkov a kolónií, environmentálnych podmienok a postupov ako v prípade testovacích nádob, ale bez testovanej chemikálie. Ak sa používa pomocné rozpúšťadlo alebo disperzant, musí sa zahrnúť ďalšia kontrola s rozpúšťadlom/disperzantom v rovnakej koncentrácii, aká sa nachádza v nádobách s testovanou chemikáliou. Počet paralelných kontrolných nádob (a v prípade potreby nádob s rozpúšťadlom) by mal byť minimálne rovnaký alebo v ideálnom prípade dvojnásobný ako počet nádob použitý pre každú testovanú koncentráciu.

30. Ak sa nevyžaduje stanovenie koncentrácie NOEC, môže sa test pozmeniť: zvýšiť počet koncentrácií a znížiť počet replikátov na koncentráciu. Musia však existovať minimálne tri kontrolné replikáty.

Expozícia

31. Kolónie pozostávajúce z 2 až 4 viditeľných lístkov sa prenesú do kultúry inokula a náhodne sa rozdelia do testovacích nádob za sterilných podmienok. Každá testovacia nádoba by mala obsahovať celkove 9 až 12 lístkov. Počet lístkov a kolónií by mal byť rovnaký v každej testovacej nádobe. Zo skúseností pri použití tejto metódy a údajov z medzilaboratórneho porovnania vyplýva, že na detekciu rozdielov v raste približne v rozsahu 4 – 7 % inhibície vypočítanej na základe rýchlosti rastu (10 – 15 % vypočítanej podľa výťažku) medzi aplikáciami chemikálie stačia tri replikáty na jednu aplikáciu chemikálie, pričom každý replikát obsahuje na začiatku 9 až 12 lístkov (7).

32. Je potrebné, aby sa testovacie nádoby v inkubátore umiestňovali náhodne, čím sa minimalizuje vplyv priestorových rozdielov v intenzite svetla alebo teplote. Takisto je potrebné blokové usporiadanie alebo náhodné premiestňovanie nádob pri vykonávaní pozorovaní (alebo častejšie premiestňovanie).

33. Ak z predbežnej skúšky stability vyplýva, že nie je možné zachovať koncentráciu testovanej chemikálie (t. j. meraná koncentrácia klesne pod 80 % nameranej počiatočnej koncentrácie) počas trvania testu (7 dní), odporúča sa vykonať semistatický test. V tom prípade by mali byť kolónie vystavené čerstvo pripraveným testovacím a kontrolným roztokom najmenej dvakrát počas testu (napr. na 3. a 5. deň). Frekvencia expozície čerstvému médiu bude závisieť od stability testovanej chemikálie. Môže byť potrebná vyššia frekvencia na zachovanie približne konštantných koncentrácií veľmi nestabilných alebo prchavých látok. V niektorých prípadoch môže byť potrebné použiť prietokový postup (8) (10).

34. Expozičný scenár aplikácie na listy (sprejom) sa v tejto testovacej metóde nenachádza, preto pozri odkaz v literatúre pod číslom (11).

Podmienky inkubácie

35. Použije sa kontinuálne teplé alebo studené biele fluorescenčné osvetlenie na zabezpečenie zvolenej intenzity svetla v rozsahu 85 – 135 $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$ pri meraní vo fotosynteticky aktívnom žiarení (400 – 700 nm) v bodoch, ktoré sú v rovnakej vzdialenosti od zdroja svetla ako lístky rastliny rodu *Lemna* (v rozsahu od 6 500 do 10 000 lux). Žiadna odchýlka od zvolenej intenzity

▼M6

svetla nad plochou, kde sa uskutočňuje test, nesmie presiahnuť hodnotu ± 15 %. Metóda detekcie a merania svetla, najmä typ senzora, ovplyvní meranú hodnotu. Guľové senzory (ktoré reagujú na svetlo zo všetkých uhlov nad a pod rovinou merania) a „kosínusové“ senzory (ktoré reagujú na svetlo zo všetkých uhlov nad rovinou merania) sa uprednostňujú pred jednosmernými senzormi a poskytujú presnejšie snímanie v prípade viacbodového svetelného zdroja takého typu, aký sa uvádza v tejto metóde.

36. Teplota v testovacích nádobách by mala byť 24 °C ± 2 °C. Hodnota pH kontrolného média by sa nemala zvýšiť počas testu o viac ako 1,5 jednotky. Odchýlka o viac ako 1,5 jednotky by však nespôsobila neplatnosť testu, ak sa preukáže, že sú splnené kritériá platnosti. V určitých prípadoch je potrebné venovať zvýšenú pozornosť kolísaniu pH napr. pri testovaní nestabilných chemikálií alebo kovov. Ďalšie informácie sú uvedené v literatúre pod číslom (8).

Trvanie

37. Test sa ukončí 7 dní po premiestnení rastlín do testovacích nádob.

Merania a analytické stanovenia

38. Na začiatku testu sa spočíta a zaznamená počet lístkov v testovacích nádobách, pričom je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa spočítali vystupujúce, zreteľne viditeľné lístky. Počet lístkov, ktoré majú normálny alebo abnormálny vzhľad, je potrebné stanoviť na začiatku testu, minimálne každé 3 dni počas expozície (t. j. najmenej dvakrát počas 7 dní) a po ukončení testu. Je potrebné si všimnúť zmeny vo vývoji rastliny, napríklad vo veľkosti lístkov, vzhľade, známky nekrózy, chlorózy alebo gibozity, rozpad kolónií alebo stratu schopnosti plávať na hladine či v dĺžke a vzhľade korienkov. Je potrebné si všimnúť aj významné znaky testovacieho média (napr. prítomnosť nerozpusteného materiálu, rast rias v testovacej nádobe).

39. Okrem stanovenia počtu lístkov počas testu sa posudzujú aj účinky testovanej chemikálie na jednu (alebo viac) z týchto meraných premenných:

i) celková plocha lístkov;

ii) sušina;

iii) hmotnosť v čerstvom stave.

40. Celková plocha lístkov je výhodná, pretože sa dá stanoviť pre každý test a kontrolnú nádobu na začiatku, počas a na konci testu. Sušinu alebo hmotnosť v čerstvom stave je potrebné stanoviť na začiatku testu zo vzorky kultúry inokula, ktorá predstavuje kultúru použitú na začiatku testu a na konci testu, s rastlinným materiálom z každého testu a kontrolnej nádoby. Ak sa plocha lístkov nemeria, uprednostňuje sa sušina pred hmotnosťou v čerstvom stave.

41. Celková listová plocha, sušina a hmotnosť v čerstvom stave sa môžu stanoviť takto:

i) *celková listová plocha:* celková listová plocha všetkých kolónií sa môže stanoviť obrazovou analýzou. Siluetu testovacej nádoby a rastlín je možné zachytiť prostredníctvom videokamery (t. j. umiestnením nádoby na svetelný box) a výsledný obraz sa digitalizuje. Kalibráciou plochých tvarov známej plochy sa potom môže stanoviť celková listová plocha v testovacej nádobe. Je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa vylúčila interferencia spôsobená okrajom testovacej nádoby. Alternatívnym, ale prácnejším prístupom je urobiť fotokópiu testovacej nádoby a rastlín, vystrihnúť výslednú siluetu kolónií a stanoviť ich plochu s použitím analyzátora plochy lístkov alebo milimetrového papiera. Vhodné môžu byť aj iné techniky (napr. pomer hmotnosti papiera medzi plochou siluety kolónii a jednotkou plochy).

▼M6

ii) *sušina:* všetky kolónie sa zozbierajú z každej testovacej nádoby a opláchnu sa destilovanou alebo deionizovanou vodou. Osušia sa, aby sa odstránila nadbytočná voda, a potom sa sušia pri 60 °C na konštantnú hmotnosť. Musia obsahovať všetky úlomky korienkov. Sušina sa musí vyjadriť s presnosťou minimálne 0,1 mg.

iii) *hmotnosť v čerstvom stave:* všetky kolónie sa prenesú do predvážených polystyrénových skúmaviek (alebo z iného inertného materiálu) s malými (1 mm) otvormi v zaoblených dnách. Skúmavky sa potom 10 minút centrifugujú pri rýchlosti 3 000 ot/min a pri izbovej teplote. Skúmavky obsahujúce už vysušené kolónie sa opätovne prevážia a hmotnosť v čerstvom stave sa vypočíta odpočítaním hmotnosti prázdnej skúmavky.

Frekvencia meraní a analytické stanovenia

42. Ak sa použije statický test, na začiatku a na konci testu by sa mala zmerať hodnota pH každej vzorky s aplikovanou chemikáliou. Ak sa použije semistatický test, hodnota pH by sa mala zmerať v každej dávke „čerstvého“ testovacieho roztoku pred každým obnovením a aj v zodpovedajúcich „spotrebovaných“ roztokoch.

43. Svietivosť by sa mala merať v rastovej komore, inkubátore alebo miestnosti v bodoch v rovnakej vzdialenosti od zdroja svetla ako lístky rastliny rodu *Lemna*. Merania by sa mali vykonať minimálne jedenkrát počas testu. Teplota média v náhradnej nádobe udržiavanej v rovnakých podmienkach v rastovej komore, inkubátore alebo miestnosti by sa mala zaznamenať minimálne jedenkrát za deň.

44. Počas testu sa v príslušných intervaloch stanovia koncentrácie testovanej látky. V rámci statických testov je potrebné stanoviť koncentrácie minimálne na začiatku a na konci testu.

45. V rámci semistatických testov, kde sa očakáva, že hodnoty koncentrácie testovanej chemikálie nebudú v rozsahu ± 20 % nominálnej koncentrácie, je potrebné analyzovať všetky čerstvo pripravené testovacie roztoky a rovnaké roztoky pri každom obnovení (pozri bod 33). V prípade testov, kde nameraná hodnota počiatočnej koncentrácie testovanej chemikálie neleží v rozsahu ± 20 % nominálnej hodnoty, ale kde je možné poskytnúť dostačujúce dôkazy na preukázanie, že počiatočné koncentrácie sú opakovateľné a stabilné (t. j. v rozsahu od 80 do 120 % počiatočnej koncentrácie), sa však chemické stanovenia môžu vykonať iba s najvyššími a najnižšími testovanými koncentráciami. Vo všetkých prípadoch je potrebné stanoviť koncentrácie testovanej chemikálie pred obnovením iba v jednej paralelnej nádobe na každú testovaciu koncentráciu (alebo obsahy nádob rozdelených do replikátov).

46. Ak sa použije prietokový test, je vhodný podobný systém odberu vzoriek, ako je uvedený pre semistatické testy, vrátane analýzy na začiatku, v polovici a na konci testu, pričom meranie „spotrebovaných“ roztokov v tomto prípade nie je vhodné. Pri tomto type testu sa musí denne kontrolovať prietoková rýchlosť riedidla a testovanej chemikálie alebo zásobného roztoku testovanej chemikálie.

47. Ak je dokázané, že koncentrácia chemikálie, ktorá sa testuje, je počas testu v dostatočnej miere udržiavaná v rozsahu ± 20 % nominálnej hodnoty alebo nameranej počiatočnej koncentrácie, analýza výsledkov sa môže zakladať na nominálnych alebo nameraných počiatočných hodnotách. Ak je odchýlka od nominálnej alebo nameranej počiatočnej koncentrácie väčšia ako ± 20 %, analýza výsledkov by sa mala zakladať na geometrickej strednej koncentrácii počas expozície alebo na modeloch opisujúcich pokles koncentrácie testovanej chemikálie (8).

▼M6

Limitný test

48. V určitých situáciách, napríklad keď z predbežného testu vyplýva, že testovaná chemikália nemá žiadne toxické účinky pri koncentráciách do 100 mg/l alebo do jej limitu rozpustnosti v testovacom médiu (podľa toho, ktorá hodnota je nižšia), sa môže vykonať limitný test umožňujúci porovnanie reakcií v kontrolnej skupine a jednej skupine s aplikovanou chemikáliou (100 mg/l alebo koncentrácia rovná limitu rozpustnosti). Dôrazne sa odporúča, aby sa táto skutočnosť zakladala na analýze expozičnej koncentrácie. Na limitný test sa vzťahujú všetky už uvedené testovacie podmienky a kritériá platnosti s výnimkou, že počet replikátov s aplikovanou chemikáliou by mal byť dvojnásobný. Rast v kontrolnej skupine a skupine s aplikovanou chemikáliou sa môže analyzovať použitím štatistického testu na porovnanie stredných hodnôt napr. Studentovho t-testu.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Čas zdvojnásobenia

49. Na stanovenie času zdvojnásobenia (T_d) počtu lístkov a pri dodržaní tohto kritéria platnosti podľa štúdie (bod 12) sa použije tento vzorec s údajmi, ktoré sa získali z kontrolných nádob:

$$T_d = \ln 2/\mu,$$

kde μ je priemerná špecifická rýchlosť rastu stanovená postupom opísaným v bodoch 54 a 55.

Premenné hodnoty reakcie

50. Účelom testu je stanoviť účinky testovanej chemikálie na vegetatívny rast rastlín rodu *Lemna*. Táto testovacia metóda opisuje dve závisle premenné veličiny reakcie, keďže rôzne jurisdikcie majú rozdielne preferencie a regulačné požiadavky. Na to, aby boli výsledky testu prijateľné vo všetkých jurisdikciách, by sa účinky mali hodnotiť s použitím obidvoch uvedených závisle premenných reakcie a) a b).

a) *Priemerná špecifická rýchlosť rastu:* táto závisle premenná veličina reakcie sa vypočíta na základe zmien logaritmu počtu lístkov a navyše na základe zmien logaritmu iného parametra merania (celková listová plocha, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave) v čase (vyjadrené za deň) v kontrolných skupinách a v každej skupine s aplikovanou chemikáliou. Niekedy sa uvádza ako relatívna rýchlosť rastu (12).

b) *Výťažok:* táto závisle premenná veličina reakcie sa vypočíta na základe zmien počtu lístkov a navyše na základe zmien iného parametra merania (celková listová plocha, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave) v kontrolných skupinách a v každej skupine s aplikovanou chemikáliou až do ukončenia testu.

51. Je potrebné si uvedomiť, že hodnoty toxicity vypočítané použitím týchto dvoch závisle premenných veličín reakcie nie sú porovnateľné a tento rozdiel sa musí zohľadniť pri použití výsledkov testu. Pri dodržaní testovacích podmienok tejto testovacej metódy budú hodnoty EC_x založené na priemernej špecifickej rýchlosti rastu (E_rC_x) spravidla vyššie ako výsledky založené na výťažku (E_yC_x), a to v dôsledku matematického základu príslušných postupov. Nemalo by sa to vysvetľovať ako rozdiel v citlivosti medzi obidvoma závisle premennými veličinami reakcie, ale len tak, že sa hodnoty odlišujú matematicky. Koncepcia priemernej špecifickej rýchlosti rastu sa zakladá na všeobecnom exponenciálnom modeli rastu žaburiniek v nelimitovaných kultúrach, kde sa toxicita stanovuje na základe účinkov na rýchlosť rastu, bez závislosti od absolútnej úrovne špecifickej rýchlosti rastu kontrolnej kultúry, od sklonu krivky závislosti veličiny koncentrácie alebo

▼M6

od dĺžky testu. Naopak je to v prípade výsledkov založených na závisle premennej veličine výťažku, ktoré sú závislé od všetkých ďalších premenných. Hodnota E_yC_x je závislá od špecifickej rýchlosti rastu žaburiniek, ktoré sa používajú v každom teste, a od maximálnej špecifickej rýchlosti rastu, ktorá sa môže meniť medzi druhmi a dokonca aj medzi odlišnými klonmi. Táto závisle premenná veličina by sa nemala používať na porovnávanie citlivosti na toxické látky medzi druhmi žaburinky alebo dokonca medzi odlišnými klonmi. Zatiaľ čo z vedeckého hľadiska sa na odhady toxicity uprednostňuje použitie priemernej špecifickej rýchlosti rastu, do tejto testovacej metódy bolo zahrnuté aj stanovenie toxicity na základe výťažku, aby sa tak vyhovelo regulačným požiadavkám platným v rámci niektorých jurisdikcií.

52. Odhady toxicity by sa mali zakladať na počte lístkov a na jednej ďalšej meranej premennej (celková listová plocha, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave), keďže niektoré chemikálie môžu oveľa viac ovplyvniť iné merané premenné ako počet lístkov. Tento účinok by sa nemal stanovovať iba na základe počítania počtu lístkov.

53. Počet lístkov, ako aj každá iná zaznamenaná meraná premenná, t. j. celková listová plocha, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave, sa pri každom meraní zapíše do tabuľky spolu s koncentráciami testovanej chemikálie. Následná analýza údajov, napríklad odhad koncentrácií LOEC, NOEC alebo EC_x, by sa mala zakladať na hodnotách pre jednotlivé replikáty a nie na vypočítaných stredných hodnotách pre každú skupinu s aplikovanou chemikáliou.

Priemerná špecifická rýchlosť rastu

54. Priemerná špecifická rýchlosť rastu za konkrétny čas sa vypočíta ako logaritmus nárastu premenných rastu – počtu lístkov a jednej ďalšej meranej premennej (celková listová plocha, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave) – použitím uvedeného vzorca pre každý replikát kontrolných vzoriek a vzoriek s aplikovanou chemikáliou:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

kde:

— μ_{i-j}: priemerná špecifická rýchlosť rastu od času i do j,

— N_i: meraná premenná v testovacej alebo kontrolnej nádobe v čase i,

— N_j: meraná premenná v testovacej alebo kontrolnej nádobe v čase j,

— t: čas medzi i a j.

Pre každú skupinu s aplikovanou chemikáliou a kontrolnú skupinu sa vypočíta stredná hodnota rýchlosti rastu spolu s odhadmi rozptylu.

55. Priemerná špecifická rýchlosť rastu by sa mala vypočítať pre celý čas testu (čas „i“ v uvedenom vzorci je začiatok testu a čas „j“ je koniec testu). Pre každú testovanú koncentráciu a kontrolnú vzorku sa vypočíta stredná hodnota priemernej špecifickej rýchlosti rastu spolu s odhadmi rozptylu. Okrem toho by sa mala posúdiť fázová rýchlosť rastu, aby sa vyhodnotili účinky testovanej chemikálie, ktoré sa vyskytnú počas expozície (napr. skontrolovaním logaritmicky transformovaných rastových kriviek). Zo značných rozdielov medzi fázovou rýchlosťou rastu a priemernou rýchlosťou rastu vyplýva odchýlka od konštantného exponenciálneho rastu, ako aj skutočnosť, že bolo zaručené dôkladné preskúmanie rastových kriviek. V tomto prípade by bolo konzervatívnym prístupom porovnávanie špecifických rýchlostí rastu kultúr s aplikovanou chemikáliou počas maximálnej inhibície so špecifickými rýchlosťami rastu kontrolných kultúr v tom istom čase.

56. Percentuálna inhibícia rýchlosti rastu (I_r) sa môže potom vypočítať pre každú testovaciu koncentráciu (skupinu s aplikovanou chemikáliou) podľa tohto vzorca:

▼M6

$$\% I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

kde:

— % I_r: percentuálna inhibícia priemernej špecifickej rýchlosti rastu,

— μ_C: stredná hodnota μ v kontrolnej skupine,

— μ_T: stredná hodnota pre μ v skupine s aplikovanou chemikáliou.

Výťažok

57. Účinky na výťažok sa stanovia na základe dvoch meraných premenných, počtu lístkov a jednej ďalšej meranej premennej (celková listová plocha, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave) nachádzajúcej sa v každej testovacej nádobe na začiatku a na konci testu. Pre sušinu alebo hmotnosť v čerstvom stave sa počiatočné množstvo biomasy stanoví na základe vzorky lístkov odobratých z rovnakej dávky použitej na inokuláciu testovacích nádob (pozri bod 20). Pre každú testovanú koncentráciu a kontrolnú vzorku sa vypočíta stredná hodnota výťažku spolu s odhadmi rozptylu. Percentuálna inhibícia výťažku (% I_y) sa môže vypočítať pre každý replikát s aplikovanou chemikáliou takto:

$$\% I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

kde:

— % I_y : percentuálna hodnota zníženia výťažku,

— b_C : rozdiel konečného množstva biomasy a počiatočného množstva biomasy pre kontrolnú skupinu,

— b_T : rozdiel konečného množstva biomasy a počiatočného množstva biomasy v skupine s aplikovanou chemikáliou.

Zostrojenie kriviek závislosti veličiny od koncentrácie

58. Je potrebné zostrojiť krivky závislosti veličiny od koncentrácie vzťahujúce sa na strednú hodnotu percentuálnej inhibície závisle premennej veličiny reakcie (I_r alebo I_y vypočítané podľa bodov 56 alebo 57), ako aj logaritmus koncentrácie testovanej chemikálie.

Odhad koncentrácie EC_x

59. Odhady koncentrácie EC_x (napr. EC_{50}) by sa mali zakladať na priemernej špecifickej rýchlosti rastu (E_rC_x) a na výťažku (E_yC_x), pričom každý z týchto parametrov sa musí zasa zakladať na počte lístkov a jednej ďalšej meranej premennej (celková listová plocha, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave). Dôvodom je, že existujú testované chemikálie, ktoré rozdielne vplývajú na počet lístkov a na iné merané premenné. Požadovanými parametrami toxicity sú preto štyri hodnoty koncentrácie EC_x pre každú vypočítanú úroveň inhibície x: E_rC_x (počet lístkov), E_rC_x (celková listová plocha, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave), E_yC_x (počet lístkov), a E_yC_x (celková listová plocha, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave).

Štatistické postupy

60. Cieľom je získať kvantitatívny vzťah medzi koncentráciou a reakciou pomocou regresnej analýzy. Je možné použiť váženú lineárnu regresiu po vykonaní linearizovanej transformácie reakčných údajov – napríklad na probitové alebo logitové, prípadne Weibullove jednotky (13), ale uprednostňujú sa techniky nelineárnej regresie, ktorými sa lepšie spracujú nevyhnutné nepresnosti údajov a odchýlky od hladkých rozdelení. Priblížením buď

▼M6

k nulovej, alebo k úplnej inhibícii sa takéto nepresnosti môžu transformáciou zväčšiť a ovplyvniť analýzu (13). Je potrebné si uvedomiť, že štandardné metódy analýzy s použitím probitovej, logitovej alebo Weibullovej transformácie sú určené na použitie na kvantálne údaje (napr. o mortalite alebo prežití) a musia sa modifikovať, aby sa prispôsobili údajom o rýchlosti rastu alebo výťažku. Osobitné postupy na stanovenie hodnôt EC_x z kontinuálnych údajov je možné nájsť v literatúre pod číslami (14) (15) a (16).

61. Pre každú závisle premennú veličinu reakcie, ktorá sa má analyzovať, sa na výpočet bodových odhadov hodnôt ECx použije vzťah medzi koncentráciou a reakciou. Ak je to možné, je potrebné stanoviť 95 % hranice spoľahlivosti pre každý odhad. Vhodnosť reakčných údajov pre regresný model je potrebné vyhodnotiť buď graficky, alebo štatisticky. Regresná analýza sa musí vykonať s použitím reakcií jednotlivých replikátov, nie stredných hodnôt skupiny s aplikovanou chemikáliou.

62. Odhady hodnôt EC_{50} a hranice spoľahlivosti sa môžu získať aj použitím lineárnej interpolácie metódou „bootstrap“ (17), ak sú dostupné regresné modely/metódy nevhodné pre dané údaje.

63. Pre odhad koncentrácií LOEC aj NOEC je potrebné porovnať stredné hodnoty skupiny s aplikovanou chemikáliou pomocou techník pre analýzu rozptylu (ANOVA). Stredná hodnota pre každú koncentráciu sa musí potom porovnať s kontrolnou strednou hodnotou s použitím príslušného viacnásobného porovnania alebo testovacej metódy trendu. Môže sa použiť Dunnettov alebo Williamsov test (18) (19) (20) (21). Je potrebné posúdiť, či je dodržaný predpoklad homogenity rozptylu ANOVA. Toto posúdenie sa môže vykonať graficky alebo formálnym testom (22). Vhodný je Levenov alebo Bartlettov test. Nesplnenie predpokladu homogenity rozptylov je niekedy možné korigovať logaritmickou transformáciou údajov. Ak je heterogenita rozptylu extrémna a nie je možné ju korigovať transformáciou, je potrebné posúdiť analýzu metódami, ako sú napríklad „step-down Jonkheere“ testy trendu. Ďalšie informácie o stanovení hodnoty NOEC je možné nájsť v literatúre pod číslom (16).

64. Najnovší vývoj vo vede vedie k odporúčaniu upustiť od koncepcie NOEC a nahradiť ju regresiou založenou na bodovom odhade ECx. Príslušná hodnota x pre tento test na rastlinách rodu *Lemna* nebola stanovená. Vhodný sa však zdá byť rozsah 10 – 20 % (v závislosti od zvolenej závisle premennej veličiny reakcie), pričom prednostne by sa mali uvádzať hodnoty EC_{10} a EC_{20}.

Predkladanie správ

65. Skúšobný protokol musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti vrátane limitu rozpustnosti vo vode,

— identifikačné údaje chemikálie (napr. číslo CAS) vrátane čistoty (nečistôt).

Testovacie druhy:

— vedecký názov, klon (ak je známy) a zdroj.

Podmienky testu:

— použitý postup testovania (statický, semistatický alebo prietokový),

— dátum začiatku testu a jeho dĺžka,

— testovacie médium,

— opis priebehu experimentu: testovacie nádoby a veká, objemy roztokov, počet kolónií a lístkov na testovaciu nádobu na začiatku testu,

— testovacie koncentrácie (nominálne a merané podľa potreby) a počet replikátov na koncentráciu,

▼**M6**

— metódy prípravy zásobných a testovacích roztokov vrátane použitia všetkých rozpúšťadiel alebo disperzantov,

— teplota počas testu,

— zdroj svetla, svietivosť a homogenita svetla,

— hodnoty pH testovacieho a kontrolného média,

— koncentrácie testovaných chemikálií a metóda analýzy s príslušným posúdením kvality údajov (validačné štúdie, štandardné odchýlky alebo hranice spoľahlivosti analýzy),

— metódy stanovenia počtu lístkov a iných meraných premenných, napríklad sušiny, hmotnosti v čerstvom stave alebo listovej plochy,

— všetky odchýlky od tejto testovacej metódy,

Výsledky:

— nespracované údaje: počet lístkov a iné merané premenné v každej testovacej a kontrolnej nádobe pri každom pozorovaní a analýze,

— stredné hodnoty a štandardné odchýlky pre každú meranú premennú,

— rastové krivky pre každú koncentráciu (odporúčané s logaritmicky transformovanou meranou premennou, pozri bod 55),

— čas zdvojnásobenia/rýchlosť rastu v kontrolných vzorkách na základe počtu lístkov,

— vypočítané hodnoty závisle premenných veličín reakcie pre každý replikát s aplikovanou chemikáliou, so strednými hodnotami a variačným koeficientom pre replikáty,

— grafické znázornenie vzťahu koncentrácie a účinku,

— odhady toxicity pre závisle premenné veličiny reakcie napr. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, a príslušné intervaly spoľahlivosti; ak sa vypočítavajú, hodnoty LOEC a/alebo NOEC a štatistické metódy použité na ich stanovenie,

— ak sa používa technika ANOVA, veľkosť účinku, ktorý je možné detegovať (napr. najmenej významný rozdiel),

— každá stimulácia rastu zistená v ľubovoľnej vzorke s aplikovanou chemikáliou,

— všetky viditeľné znaky fytotoxicity, ako aj pozorovania testovacích roztokov,

— rozbor výsledkov vrátane každého vplyvu na výsledok testu vyplývajúceho z odchýlok od tejto testovacej metódy.

LITERATÚRA

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. (vo švédštine).

▼**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

Dodatok 1

Vymedzenia pojmov

Na účely tejto testovacej metódy sa používajú tieto pojmy a skratky:

Biomasa je sušina živej hmoty nachádzajúcej sa v populácii. V tomto teste biomasu nahrádza napríklad počet lístkov alebo plocha lístkov, ktoré sa bežne merajú, a používanie pojmu „biomasa“ sa teda vzťahuje aj na tieto náhradné kritériá.

Chemikália je látka alebo zmes.

Chloróza je žltnutie tkaniva lístkov.

Klon je organizmus alebo bunka, ktorá vznikla z jedného jedinca nepohlavným rozmnožovaním. Jedince z rovnakého klonu sú preto geneticky identické.

Kolónia znamená zhluk navzájom spojených materských a dcérskych lístkov (obvykle 2 až 4). Niekedy sa uvádza ako rastlina.

EC_x je koncentrácia testovanej chemikálie rozpustenej v testovacom médiu, ktorej dôsledkom je x % (napr. 50 %) zníženie rastu rastlín rodu *Lemna* v rámci stanoveného času expozície (je potrebné výslovne uviesť, ak sa odchyľuje od celkovej alebo obvyklej dĺžky testu). Na jednoznačné označenie hodnoty EC odvodenej z rýchlosti rastu alebo výťažku sa používa symbol „E_rC“ pre rýchlosť rastu a symbol „E_yC“ pre výťažok, potom nasleduje použitá meraná premenná napr. „E_rC“ (počet lístkov).

Prietokový test je test, v ktorom sa testovacie roztoky kontinuálne nahrádzajú.

Lístok je individuálna/samostatná „lístkovitá“ štruktúra žaburinky. Je to najmenšia jednotka, resp. jedinec schopný rozmnožovania.

Gibozita je stav, keď lístky rastliny majú vypuklý alebo napuchnutý vzhľad.

Rast je nárast meranej premennej, napríklad počtu lístkov, sušiny, hmotnosti vo vlhkom stave alebo plochy lístkov, počas testu.

Rýchlosť rastu (priemerná špecifická rýchlosť rastu) je logaritmickým nárastom množstva biomasy počas expozície.

Najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC) je najnižšia testovacia koncentrácia, pri ktorej sa pozoruje, že chemikália má štatisticky významný účinok na zníženie rastu (pri $p < 0,05$) v porovnaní s kontrolnou kultúrou v rámci daného času expozície. Škodlivý účinok všetkých testovacích koncentrácií nad LOEC však musí byť vždy rovnaký alebo väčší ako účinky pozorované pri LOEC. Ak nie sú splnené tieto dve podmienky, je potrebné poskytnúť úplné vysvetlenie, akým spôsobom sa zvolila koncentrácia LOEC (a teda aj koncentrácia NOEC).

Merané premenné sú všetky typy premenných, ktoré sa merajú na vyjadrenie konečného parametra testu použitím jednej alebo viacerých závisle premenných veličín reakcie. V rámci tejto metódy sú meranými premennými počet lístkov, listová plocha, hmotnosť v čerstvom stave a sušina.

Monokultúra je kultúra s jedným druhom rastliny.

Nekróza je odumreté (t. j. biele alebo rozmočené) tkanivo lístkov.

Koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC) je testovacia koncentrácia bezprostredne pod koncentráciou LOEC.

Fenotyp je viditeľná charakteristika organizmu určená interakciou jeho génov s jeho prostredím.

Závisle premenná veličina reakcie je premenná na odhad toxicity odvodená zo všetkých meraných premenných opisujúcich biomasu rôznymi metódami výpočtu. V prípade tejto testovacej metódy sú závislými premennými rýchlosti rastu a výťažok, ktoré sú odvodené od meraných premenných, ako je počet lístkov, listová plocha, hmotnosť v čerstvom stave alebo sušina.

▼M6

Semistatický (obnovovací) test je test, v ktorom sa testovací roztok počas testu pravidelne nahrádza v stanovených intervaloch.

Statický test je testovacia metóda bez obnovy testovacieho roztoku počas testu.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Konečný parameter testu znamená všeobecný faktor, ktorý sa testovanou chemikáliou v porovnaní s kontrolnou vzorkou zmení ako cieľ testu. V prípade tejto testovacej metódy je konečným parametrom inhibícia rastu, ktorá sa dá vyjadriť rôznymi závisle premennými veličinami reakcie založenými na jednej alebo viacerých meraných premenných.

Testovacie médium je kompletné syntetické rastové médium, v ktorom rastú testovacie rastliny vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie. Testovaná chemikália sa spravidla rozpustí v testovacom médiu.

Výťažok je rozdiel hodnoty meranej premennej, ktorá vyjadruje množstvo biomasy, na konci expozície a hodnoty meranej premennej na jej začiatku.

▼M6

Dodatok 2

Opis rodu *Lemna*

Vodná rastlina bežne nazývaná žaburinka (*Lemna* spp.) patrí do čeľade *Lemnaceae*, ktorá má množstvo druhov rozšírených po celom svete v štyroch rodoch. Ich odlišný vzhľad a taxonómia sú dôkladne opísané v literatúre pod číslami (1) (2). *Lemna gibba* a *Lemna minor* sú druhy zastúpené v miernych pásmach a bežne sa používajú na testy toxicity. Obidva druhy majú plávajúcu alebo ponorenú byľ v tvare disku (lístok) a veľmi tenký koreň vychádzajúci zo stredu spodnej plochy každého lístka. Rastliny rodu *Lemna* zriedkavo vytvárajú kvety a rozmnožujú sa vegetatívne vytváraním nových lístkov (3). Mladšie rastliny v porovnaní so staršími bývajú bledšie, majú kratšie korene a skladajú sa z dvoch až troch lístkov rôznych veľkostí. Malá veľkosť rastliny *Lemna*, jej jednoduchá štruktúra, nepohlavné rozmnožovanie a krátky čas vývoja umožňujú, že rastliny tohto rodu sú veľmi vhodné na laboratórne testovanie (4) (5).

Vzhľadom na pravdepodobné medzidruhové rozdiely v citlivosti sú platné iba porovnania citlivosti v rámci jedného druhu.

Príklady druhov *Lemna*, ktoré sa používajú na testovanie: literatúra k jednotlivým druhom

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. (in Swedish).

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.

Zdroje druhov *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Tel: +1-416-978-3641
Fax:+1-416-978-5878
e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca

▼**M6**

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
USA
phone 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
STOCKHOLM
ŠVÉDSKO
Tel: +46 8 674 7240
Fax +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
NEMECKO
e-mail: lemna@uba.de

LITERATÚRA

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**

Dodatok 3

Uchovávanie zásobnej kultúry

Zásobné kultúry sa môžu dlhší čas uchovávať pri nižších teplotách (4 – 10 °C) bez toho, aby ich bolo potrebné opätovne pripraviť. Rastové médium pre rastliny rodu *Lemna* môže byť rovnaké, ako sa používa na testovanie, ale pre zásobné kultúry sa môžu použiť iné médiá bohaté na živiny.

Pravidelne sa pomocou sterilných nástrojov premiestni množstvo mladých svetlozelených rastlín do nových kultivačných nádob obsahujúcich čerstvé médium. Pri nižšej teplote navrhnutej v tomto materiáli sa môže čiastočná kultivácia vykonávať až v trojmesačných intervaloch.

Mali by sa používať chemicky čisté (umyté v kyseline) a sterilné sklenené kultivačné nádoby a sterilné postupy. V prípade kontaminácie zásobnej kultúry, napríklad riasami alebo plesňami, je potrebné prijať opatrenia na odstránenie kontaminujúcich organizmov. V prípade rias a väčšiny iných kontaminujúcich organizmov je to možné docieliť povrchovou sterilizáciou. Odoberie sa vzorka kontaminovaného rastlinného materiálu a korienky sa odstrihnú. Následne sa materiál prudko pretrepe v čistej vode, následne sa ponorí do 0,5 % (v/v) roztoku chlórnanu sodného na 30 sekúnd až 5 minút. Rastlinný materiál sa potom opláchne sterilnou vodou a prenesie v niekoľkých dávkach do kultivačných nádob obsahujúcich čerstvé rastové médium. V dôsledku tohto postupu veľa lístkov uhynie, najmä ak sa použijú dlhšie expozičné časy, ale tie, ktoré prežijú, sú obvykle nekontaminované. Tieto sa môžu potom použiť na opätovné naočkovanie nových kultúr.

▼M6

Dodatok 4

Médiá

Odporúčajú sa rôzne rastové médiá pre druhy *L. minor* a *L. gibba*. Pre *L. minor* sa odporúča modifikované médium podľa švédskej normy (SIS), zatiaľ čo pre *L. gibba* sa odporúča médium 20X AAP. Zloženia obidvoch médií sú uvedené nižšie. Pri príprave týchto médií sa musia použiť reagenty alebo chemikálie analytickej kvality a deionizovaná voda.

Rastové médium podľa švédskej normy (SIS) pre rastliny rodu *Lemna*

— Zásobné roztoky I – V sa sterilizujú v autokláve (120 °C, 15 minút) alebo membránovou filtráciou (veľkosť pórov približne 0,2 μm).

— Zásobný roztok VI (a voliteľne VII) sa sterilizuje iba membránovou filtráciou, nie je potrebné ho autoklávovať.

— Sterilné zásobné roztoky by sa mali skladovať v chlade a tme. Zásobné roztoky I – V by sa mali vyradiť po šiestich mesiacoch, zatiaľ čo zásobný roztok VI (a voliteľne VII) má čas použiteľnosti jeden mesiac.

Číslo zásobného roztoku:	Látka	Koncentrácia v zásobnom roztoku (g/l)	Koncentrácia v pripravenom médiu (mg/•l)	Pripravené médium	
				Prvok	Koncentrácia (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	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA $2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (tlmiaci roztok)	490	490	—	—

Na prípravu jedného litra média SIS sa do 900 ml deionizovanej vody pridá:

▼M6

— 10 ml zásobného roztoku I,

— 5 ml zásobného roztoku II,

— 5 ml zásobného roztoku III,

— 5 ml zásobného roztoku IV,

— 1 ml zásobného roztoku V,

— 5 ml zásobného roztoku VI,

— 1 ml zásobného roztoku VII (voliteľné).*Poznámka:* Ďalší zásobný roztok VII (tlmivý roztok MOPS) môže byť potrebný pre určité testované chemikálie (pozri bod 11).

Hodnota pH sa nastaví na 6,5 ± 0,2 pridaním 0,1 alebo 1 mol HCl alebo NaOH a objem sa doplní do jedného litra deionizovanou vodou.

Rastové médium 20X AAP

Zásobné roztoky sa pripravia v sterilnej destilovanej alebo deionizovanej vode.

Sterilné zásobné roztoky by sa mali skladovať v chlade a tme. V týchto podmienkach budú mať zásobné roztoky čas použiteľnosti minimálne 6 až 8 týždňov.

Pre médium 20X – AAP sa pripraví päť živných zásobných roztokov (A1, A2, A3, B a C) a použijú sa chemikálie reagenčnej kvality. Na prípravu rastového média sa pridá 20 ml každého živného zásobného roztoku do približne 850 ml deionizovanej vody. Hodnota pH sa nastaví na 7,5 ± 0,1 pridaním 0,1 alebo 1 mol HCl alebo NaOH a objem sa doplní do jedného litra deionizovanou vodou. Médium sa potom prefiltruje do sterilnej nádoby cez 0,2 μm (približne) membránový filter.

Rastové médium určené na testovanie by sa malo pripraviť jeden až dva dni pred použitím, aby sa stabilizovala hodnota pH. Pred použitím sa skontroluje pH rastového média a v prípade potreby sa znovu upraví pridaním 0,1 alebo 1 mol NaOH alebo HCl, ako sa uvádza vyššie.

Číslo zásobného roztoku:	Látka	Koncentrácia v zásobnom roztoku (g/•l) (*)	Koncentrácia v pripravenom médiu (mg/•l) (*)	Pripravené médium	
				Prvok	Koncentrácia (mg/•l) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na;N	190; 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2.O$	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**

Číslo zásobného roztoku:	Látka	Koncentrácia v zásobnom roztoku (g/•l) (*)	Koncentrácia v pripravenom médiu (mg/•l) (*)	Pripravené médium	
				Prvok	Koncentrácia (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

(*) Pokiaľ nie je známa.

Poznámka: Teoreticky vhodná konečná koncentrácia hydrogénuhličitanu (ktorým by sa zabránilo značnému upravovaniu pH) je 15 mg/l a nie 300 mg/l. Používanie média 20X – AAP v minulosti vrátane kruhového testu pre túto metódu je založené na koncentrácii 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse a 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.)

STEINBERGOVO médium (podľa normy ISO 20079)

Koncentrácie a zásobné roztoky

Modifikované Steinbergovo médium sa používa v rámci normy ISO 20079 len pre druh *Lemna minor* (lebo iba druh *Lemna minor* je v tomto prípade povolený), ale z testov vyplýva, že dobré výsledky je možné dosiahnuť aj s druhom *Lemna gibba*.

Pri príprave média by sa mali použiť chemikálie reagenčnej alebo analytickej kvality a deionizovaná voda.

Pripraví sa médium obsahujúce živiny zo zásobných roztokov alebo desaťnásobne koncentrované médium, ktoré umožňuje maximálnu koncentráciu média bez vyzrážania.

Tabuľka 1

STEINBERGOVO médium so stabilizovanou hodnotou pH (modifikované podľa Altenburgera)

Zložka		Médium obsahujúce živiny	
makroprvky	molárna hmotnosť	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**

Zložka		Médium obsahujúce živiny	
mikroprvky	molárna hmotnosť	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 dinátrium-dihydrát	372,24	1 500,0	4,03

Tabuľka 2

Zásobné roztoky (makroprvky)

1. Makroprvky (50-krát koncentrovaný)	**(g/l)**
Zásobný roztok 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Zásobný roztok 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Zásobný roztok 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tabuľka 3

Zásobné roztoky (mikroprvky)

2. Mikroprvky (1 000-krát koncentrovaný)	**mg/l**
Zásobný roztok 4:	
H_3BO_3	120,0
Zásobný roztok 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Zásobný roztok 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Zásobný roztok 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Zásobný roztok 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA dinátrium-dihydrát	1 500,0

— Môžu sa použiť zásobné roztoky 2 a 3 a samostatne 4 až 7 (pri zohľadnení požadovaných koncentrácií).

▼**M6**

— Dlhší čas použiteľnosti sa dosiahne sterilizovaním zásobných roztokov v autokláve pri teplote 121 °C počas 20 minút, prípadne sterilnou filtráciou (0,2 μm). Pre zásobný roztok 8 sa dôrazne odporúča sterilná filtrácia (0,2 μm).

Príprava konečnej koncentrácie STEINBERGOVHO média (modifikované)

— Do približne 900 ml deionizovanej vody sa pridá 20 ml zásobných roztokov 1, 2 a 3 (pozri tabuľku 2), aby sa zabránilo vyzrážaniu.

— Pridá sa 1,0 ml zásobných roztokov 4, 5, 6, 7 a 8 (pozri tabuľku 3).

— Hodnota pH by mala byť 5,5 ± 0,2 (upraví sa pridaním minimálneho objemu roztoku NaOH alebo HCl).

— Doplní sa vodou do 1 000 ml.

— Ak sú zásobné roztoky sterilné a použije sa vhodná voda, ďalšia sterilizácia nie je potrebná. Ak sa sterilizuje konečné médium, zásobný roztok 8 by sa mal pridať po autoklávovaní (pri teplote 121 °C počas 20 minút).

Príprava desaťkrát koncentrovaného STEINBERGOVHO média (modifikovaného) na dočasné skladovanie

— Do približne 30 ml deionizovanej vody sa pridá 20 ml zásobných roztokov 1, 2 a 3 (pozri tabuľku 2), aby sa zabránilo vyzrážaniu.

— Pridá sa 1,0 ml zásobných roztokov 4, 5, 6, 7 a 8 (pozri tabuľku 3). Doplní sa vodou do 100 ml.

— Ak sú zásobné roztoky sterilné a použije sa vhodná voda, ďalšia sterilizácia nie je potrebná. Ak sa sterilizuje konečné médium, zásobný roztok 8 by sa mal pridať po autoklávovaní (pri teplote 121 °C počas 20 minút).

— Hodnota pH média (konečná koncentrácia) by mala byť 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27 TEST TOXICITY CHIRONOMIDAE V SYSTÉME SEDIMENT – VODA ZA POUŽITIA OBOHATENÉHO SEDIMENTU

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov (TG) 218 (2004). Táto testovacia metóda bola vypracovaná s cieľom hodnotiť účinky predĺženého pôsobenia chemikálií na vodné larvy dvojkrídlovcov rodu *Chironomus* žijúce v sedimente. Vychádza z existujúcich protokolov o testoch toxicity pri druhoch *Chironomus riparius* a *Chironomus tentans*, ktoré boli vypracované v Európe (1) (2) (3) a Severnej Amerike (4) (5) (6) (7) (8) a boli podrobené kruhovým testom (1) (6) (9). Môžu sa použiť aj iné dobre zdokumentované druhy pakomárov, napr. *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. Expozičný scenár použitý v tejto testovacej metóde je obohacovanie sedimentu testovanou látkou. Výber vhodného expozičného scenára závisí od plánovaného použitia testu. Scenár obohacovania sedimentu je určený na simuláciu akumulovaných úrovní chemikálií pretrvávajúcich v sedimente. Tento expozičný systém zahŕňa obohacovanie sedimentu v testovacom systéme sediment – voda.

3. Látky, ktoré je potrebné testovať na organizmoch žijúcich v sedimente, zvyčajne pretrvajú v tomto kompartmente dlhý čas. Organizmy žijúce v sedimente môžu byť exponované viacerými spôsobmi. Relatívny význam každého spôsobu expozície a časové obdobie, v ktorom sa každý z nich podieľa na celkových toxických účinkoch, závisí od fyzikálno-chemických vlastností danej chemikálie. V prípade silno adsorbujúcich látok (napr. s log K_{ow} > 5) alebo látok, ktoré sa kovalentne viažu na sediment, môže byť významným spôsobom expozície prijímanie kontaminovanej potravy. S cieľom zabrániť podhodnoteniu toxicity vysokolipofilných látok možno zvážiť použitie potravy pridanej do sedimentu pred aplikáciou testovanej látky. S cieľom zohľadniť všetky potenciálne spôsoby expozície sa táto testovacia metóda zameriava na dlhodobú expozíciu. Trvanie testu je v rozsahu 20 – 28 dní v prípade druhov *C. riparius* a *C. yoshimatsui* a 28 – 65 dní pri *C. tentans*. Ak sú na špecifické účely potrebné krátkodobé údaje, napríklad s cieľom skúmať účinky nestabilnej chemikálie, môžu sa po desiatich dňoch odstrániť ďalšie replikáty.

4. Meranými parametrami sú celkový počet vykuklených dospelých jedincov a čas do vykuklenia. Ak sú potrebné ďalšie krátkodobé údaje, odporúča sa vykonať merania prežitia a rastu lariev až po desiatich dňoch s použitím ďalších replikátov podľa potreby.

5. Odporúča sa použiť umelo pripravený sediment. Umelo pripravený sediment má oproti prírodným sedimentom niekoľko výhod:

   — zníži sa variabilita testu, lebo umelo pripravený sediment vytvára reprodukovateľnú „štandardizovanú matricu“, a odstráni sa potreba nájsť nekontaminované a čisté zdroje sedimentu,

   — testy je možné začať kedykoľvek bez problému sezónnej variability v testovanom sedimente a nie je potrebné sediment predpripraviť, aby sa odstránila pôvodná fauna. Použitie umelo pripraveného sedimentu takisto znižuje náklady spojené s odberom dostatočných množstiev sedimentu v teréne na rutinné testovanie,

   — použitie umelo pripraveného sedimentu umožňuje porovnanie toxicity a následné zatriedenie látok.

6. Vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 1.

▼M4

PRINCÍP TESTU

7. Larvy pakomárov v prvom instare sú exponované rozsahu koncentrácií testovanej chemikálie v systémoch sediment – voda. Sediment sa obohatí testovanou látkou a následne sa larvy prvého instaru zavedú do testovacích kadičiek, v ktorých sa stabilizovali koncentrácie sedimentu a vody. Na konci testu sa meria vykuklenie pakomárov a vývojový pomer. Podľa potreby sa môže po desiatich dňoch merať aj prežitie a hmotnosť lariev (pomocou ďalších replikátov podľa potreby). Tieto údaje sa analyzujú buď prostredníctvom regresného modelu na odhadnutie koncentrácie, ktorá by spôsobila × % pokles vo vykuklení, prežívaní lariev alebo raste (napr. EC_{15}, EC_{50} atď.), alebo prostredníctvom testovania štatistickej hypotézy na stanovenie koncentrácie NOEC/LOEC. Pri druhom spôsobe je potrebné pomocou štatistických testov porovnať hodnoty účinkov s kontrolnými hodnotami.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

8. Je potrebné poznať rozpustnosť testovanej látky vo vode, jej tlak pary, namerané alebo vypočítané delenie na sediment a stabilitu vo vode a v sedimente. Mala by byť k dispozícii spoľahlivá analytická metóda so známou a zdokumentovanou presnosťou a detekčným limitom na kvantifikáciu testovanej látky v nadložnej vode, pórovej vode a sedimente. Medzi užitočné informácie patrí štrukturálny vzorec a čistota testovanej látky. Užitočnou informáciou je aj chemický osud testovanej chemikálie (napr. rozptýlenie, abiotická a biotická degradácia atď.). Ďalšie informácie pre testované látky s fyzikálno-chemickými vlastnosťami, ktoré sťažujú ich testovanie, sú uvedené v odkaze (12).

REFERENČNÉ CHEMIKÁLIE

9. Referenčné chemikálie sa môžu testovať pravidelne ako prostriedok na zabezpečenie spoľahlivosti testovacieho protokolu a testovacích podmienok. Príkladmi referenčných toxických látok, ktoré sa úspešne používajú v kruhových testoch a overovacích štúdiách, sú: lindán, trifluralín, pentachlórfenol, chlorid kademnatý a chlorid draselný (1) (2) (5) (6) (13).

PLATNOSŤ TESTU

10. Pre platnosť testu je potrebné uplatňovať tieto podmienky:

— vykuklenie v kontrolných skupinách musí byť na konci testu na úrovni minimálne 70 % (1) (6),

— vykuklenie druhov *C. riparius* a *C. yoshimatsui* na dospelé jedince z kontrolných nádob by malo nastať 12 – 23 dní po ich vložení do nádob. V prípade druhu C. tentans je potrebné obdobie 20 – 65 dní,

— na konci testu je potrebné zmerať v každej nádobe pH a koncentráciu rozpusteného kyslíka. Koncentrácia kyslíka by pri použitej teplote mala predstavovať najmenej 60 % saturačnej hodnoty vzduchom (ASV) a hodnota pH nadložnej vody by vo všetkých testovacích nádobách mala byť v rozmedzí 6 – 9,

— teplota vody by sa nemala líšiť o viac ako ± 1,0 °C. Teplotu vody je možné kontrolovať pomocou izotermickej komory a v tom prípade je potrebné v primeranom časovom intervale potvrdiť teplotu v komore.

▼M4

OPIS METÓDY

Testovacie nádoby

11. Štúdia sa vykonáva v sklenených kadičkách s objemom 600 ml a s priemerom 8 cm. Sú vhodné aj iné nádoby, ale musia zaručiť vhodnú hĺbku nadložnej vody a sedimentu. Povrch sedimentu by mal byť dostatočne veľký, aby poskytoval 2 – 3 cm^2 priestoru na larvu. Pomer hĺbky vrstvy sedimentu k hĺbke nadložnej vody by mal byť 1: 4. Testovacie nádoby a iné prístroje, ktoré prichádzajú do styku s testovacím systémom, by mali byť vyrobené výlučne zo skla alebo iného chemicky inertného materiálu (napr. teflónu).

Výber druhov

12. Uprednostňovaným druhom na použitie v teste je *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* je takisto vhodný, ale je náročnejší na starostlivosť a vyžaduje si dlhšie trvanie testu. Možno použiť aj *Chironomus yoshimatsui*. Podrobné informácie o kultivačných metódach v prípade druhu *Chironomus riparius* sú uvedené v dodatku 2. Informácie o kultivačných podmienkach sú k dispozícii aj pre iné druhy, t. j. *Chironomus tentans* (4) a *Chironomus yoshimatsui* (11). Identifikácia druhov musí byť pred testovaním potvrdená, ale nevyžaduje sa pred každým testom, ak organizmy pochádzajú z internej kultúry.

Sediment

13. Uprednostňuje sa použitie umelo pripraveného sedimentu (známeho aj pod názvom rekonštituovaný, umelý alebo syntetický sediment). Ak sa však použije prírodný sediment, je potrebné ho charakterizovať (aspoň pH, obsah organického uhlíka, odporúča sa takisto stanovenie ostatných parametrov ako pomer C/N a granulometria) a nemal by obsahovať žiadne kontaminanty ani iné organizmy, ktoré by mohli s pakomármi súperiť alebo ich požierať. Takisto sa odporúča, aby bol prírodný sediment pred použitím v teste toxicity pri pakomároch na sedem dní uvedený do podmienok, ktoré budú prevládať v nasledujúcom teste. V tomto teste (1) (15) (16) sa odporúča použiť nasledujúci umelo pripravený sediment založený na umelej pôde použitej v testovacej metóde C.8 (14):

a) 4 – 5 % (suchá hmotnosť) rašeliny: čo najbližšie k pH 5,5 – 6,0. Je dôležité použiť rašelinu v práškovej forme, jemne rozomletú (veľkosť častíc ≤ 1 mm) a sušenú iba vzduchom;

b) 20 % (suchá hmotnosť) kaolínu (obsah kaolinitu podľa možnosti nad 30 %);

c) 75 – 76 % (suchá hmotnosť) kremenného piesku (mal by prevládať jemný piesok s viac ako 50 % častíc s veľkosťou od 50 do 200 μm);

d) deionizovaná voda sa pridá, aby sa dosiahla vlhkosť konečnej zmesi v rozsahu 30 - 50 %;

e) uhličitan vápenatý chemicky čistej kvality ($CaCO_3$) sa pridá, aby sa pH konečnej zmesi sedimentu upravila na 7,0 ± 0,5; obsah organického uhlíka v konečnej zmesi by mal byť 2 % (± 0,5 %) a je potrebné ho upraviť pomocou primeraného množstva rašeliny a piesku podľa písmen a) a c).

14. Zdroj rašeliny, kaolínu a piesku by mal byť známy. Je potrebné skontrolovať, či zložky sedimentu neobsahujú chemické kontaminanty (napr. ťažké kovy, organochlórové zlúčeniny, organofosforové zlúčeniny atď.). Príklad prípravy umelo pripraveného sedimentu je uvedený v dodatku 3. Miešanie suchých zložiek je takisto prípustné, ak sa preukáže, že po pridaní nadložnej vody nedochádza k separácii zložiek sedimentu (napr. k vyplaveniu častíc rašeliny) a že rašelina alebo sediment sú v dostatočnej miere uvedené do podmienok.

▼M4

Voda

15. Každá voda, ktorá vyhovuje chemickým charakteristikám prijateľnej riediacej vody podľa zoznamu uvedeného v dodatkoch 2 a 4, je vhodná ako testovacia voda. Každá vhodná voda, prírodná voda (povrchová alebo podzemná voda), rekonštituovaná voda (pozri dodatok 2) alebo odchlórovaná voda z vodovodu sú prijateľné ako voda na kultiváciu a testovacia voda, ak v nej pakomáre prežijú počas celej kultivácie a testovania bez príznakov stresu. Na začiatku testu by pH testovacej vody mala mať hodnotu medzi 6 a 9 a celková tvrdosť by nemala byť vyššia ako 400 mg/l pre $CaCO_3$. Ak však existuje podozrenie na interakciu medzi iónmi tvrdosti a testovanou látkou, mala by sa použiť voda s nižšou tvrdosťou (a v takom prípade sa teda nesmie použiť Elendtovo médium M4). Počas celej štúdie by sa mal používať rovnaký druh vody. Charakteristiky kvality vody uvedené v dodatku 4 by sa mali merať najmenej dvakrát za rok alebo ak existuje podozrenie, že sa tieto charakteristiky mohli významne zmeniť.

Zásobné roztoky – obohatené sedimenty

16. Obohatené sedimenty vybratej koncentrácie sa zvyčajne pripravujú pridaním roztoku testovanej látky priamo do sedimentu. Zásobný roztok testovanej látky rozpustenej v deionizovanej vode sa zmieša s umelo pripraveným sedimentom pomocou valcovne, stroja na miešanie krmív alebo ručným miešaním. Ak je testovaná látka slabo rozpustná vo vode, možno ju rozpustiť v čo najmenšom objeme vhodného organického rozpúšťadla (napr. hexán, acetón alebo chloroform). Tento roztok sa následne zmieša s 10 g jemného kremenného piesku na jednu testovaciu nádobu. Počká sa, kým sa rozpúšťadlo odparí, pričom sa musí z piesku celkom odstrániť. Piesok sa potom zmieša s vhodným množstvom sedimentu na testovaciu kadičku. Na zvýšenie rozpustnosti, na disperziu alebo na emulziu testovanej látky možno použiť iba látky, ktoré sú ľahko prchavé. Treba mať na pamäti, že pri príprave sedimentu je nutné zohľadniť piesok, ktorý pochádza z testovanej látky a pieskovej zmesi (t. j. sediment by sa teda mal pripraviť s menším množstvom piesku). Je nutné zabezpečiť, aby sa testovaná látka pridávaná do sedimentu v sedimente dôkladne a rovnomerne distribuovala. V prípade potreby možno na účely stanovenia stupňa homogenity analyzovať podvzorky.

KONCEPCIA TESTU

17. Koncepcia testu sa vzťahuje na výber počtu a odstup testovaných koncentrácií, počet nádob pri každej koncentrácii a počet lariev v každej nádobe. Sú tu opísané koncepcie na odhadnutie bodu EC, na odhadnutie koncentrácie NOEC a na vykonanie limitného testu.

Koncepcia regresnej analýzy

18. Účinná koncentrácia (napr. EC_{15}, EC_{50}) a koncentračný rozsah, v ktorom sa skúmajú účinky testovanej látky, sa merajú koncentráciami zahrnutými do testu. Vo všeobecnosti sú presnosť a najmä platnosť, s ktorou možno odhadovať účinné koncentrácie (EC_x), lepšie, ak je účinná koncentrácia v rozsahu testovaných koncentrácií. Je potrebné vyhýbať sa extrapolácii hlboko pod najnižšou pozitívnou koncentráciou alebo nad najvyššou koncentráciou. Pri výbere rozsahu koncentrácií, ktoré sa použijú, je užitočný predbežný test na zistenie rozsahu (pozri odsek 27).

▼M4

19. Ak je potrebné odhadnúť EC_x, malo by sa testovať najmenej päť koncentrácií a tri replikáty pre každú koncentráciu. V každom prípade sa odporúča použiť dostatočné testovacie koncentrácie, ktoré umožnia dobrý modelový odhad. Faktor medzi koncentráciami by nemal byť väčší ako dva (v prípadoch, keď má krivka závislosti reakcie od dávky plytký sklon, možno urobiť výnimku). Počet replikátov pri každej aplikácii sa môže znížiť, ak sa zvýši počet testovacích koncentrácií s rozdielnymi reakciami. Zvýšenie počtu replikátov alebo skrátenie dĺžky intervalov testovacích koncentrácií zvyčajne vedie k nižším intervalom spoľahlivosti testu. Ak sa odhaduje desaťdňové prežívanie a rast lariev, sú potrebné ďalšie replikáty.

Koncepcia odhadu NOEC/LOEC

20. Ak sa odhadujú koncentrácie LOEC alebo NOEC, použije sa päť testovacích koncentrácií s najmenej štyrmi replikátmi a faktor medzi koncentráciami by nemal byť vyšší ako 2. Počet replikátov by mal byť dostatočný, aby sa zabezpečila primeraná štatistická výpovedná hodnota na zistenie rozdielu 20 % pri kontrole pri úrovni významnosti 5 % ($p = 0,05$). V prípade vývojového pomeru je zvyčajne vhodná analýza rozptylu (ANOVA), ako napríklad Dunnettov test a Williamsov test (17) (18) (19) (20). Pri pomere vykuklenia možno použiť Cochranov-Armitageho test, Fisherov exaktný test (s Bonferroniho korekciou) alebo Mantelov-Haenszelov test.

Limitný test

21. Môže sa vykonať limitný test (jedna testovaná koncentrácia a kontrola), ak v predbežnom teste na zistenie rozsahu neboli pozorované žiadne účinky. Účelom limitného testu je vykonať test pri dostatočne vysokej koncentrácii, ktorá umožní subjektom zodpovedným za rozhodovanie vylúčiť možné toxické účinky testovanej látky a stanoviť limit pri koncentrácii, ktorá sa neočakáva v žiadnej situácii. Odporúča sa úroveň 1 000 mg/kg (suchá hmotnosť). Zvyčajne je na aplikáciu aj kontrolu potrebných najmenej šesť replikátov. Je nutné preukázať primeranú štatistickú výpovednú hodnotu na zistenie rozdielu 20 % pri kontrole pri úrovni významnosti 5 % ($p = 0,05$). V prípade metrickej reakcie (vývojový pomer a hmotnosť) je vhodnou štatistickou metódou t-test, pokiaľ údaje spĺňajú požiadavky tohto testu (normalita, homogénne rozptyly). Ak tieto požiadavky nie sú splnené, môže sa použiť t-test nerovnomerných rozptylov alebo neparametrický test ako napríklad Wilcoxonov-Mannov-Whitheyho test. Pri pomere vykuklenia je vhodný Fisherov exaktný test.

POSTUP

Podmienky expozície

Príprava systému obohatený sediment – voda

22. Postup obohacovania opísaný v testovacej metóde C.8: Toxicita pre dážďovky je odporúčaným postupom na aplikáciu testovanej látky (14). Obohatené sedimenty sa umiestnia do nádob, do ktorých sa pridá nadložná voda, aby sa vytvoril objemový pomer sediment – voda 1: 4 (pozri odseky 11 a 15). Výška vrstvy sedimentu by mala byť v rozsahu 1,5 - 3 cm. S cieľom zabrániť separácii zložiek sedimentu a resuspendovaniu jemného materiálu počas pridávania testovacej vody do vodného stĺpca môže byť sediment v čase, keď sa naň nalieva voda, prikrytý umelohmotným kotúčom, ktorý sa hneď potom odstráni. Môže byť vhodné aj použitie iných prístrojov.

23. Testovacie nádoby sa zakryjú (napr. sklenenými platňami). V prípade potreby sa počas štúdie dopĺňajú hladiny vody na pôvodný objem s cieľom kompenzovať vyparovanie vody. Na tento účel sa použije destilovaná alebo deionizovaná voda, aby sa predišlo hromadeniu solí.

▼M4

Stabilizácia

24. Keď je obohatený sediment s nadložnou vodou pripravený, je vhodné umožniť delenie testovanej látky z vodnej fázy do sedimentu (3) (4) (6) (13). To by sa podľa možnosti malo vykonať za rovnakých teplotných a prevzdušňovacích podmienok, aké sa použijú v teste. Primeraný čas vyvažovania závisí od konkrétneho sedimentu a chemikálie a môže trvať niekoľko hodín až dní a v zriedkavých prípadoch až niekoľko týždňov (štyri až päť týždňov). Keďže tým by sa poskytol čas na degradáciu mnohých chemikálií, na rovnovážny stav sa nečaká, ale odporúča sa vyvažovacie obdobie v trvaní 48 hodín. Na konci tohto ďalšieho vyvažovacieho obdobia sa odmeria koncentrácia testovanej látky v nadložnej vode, pórovej vode a sedimente aspoň pri najvyššej koncentrácii a pri jednej nižšej koncentrácii (pozri odsek 38). Tieto analytické skúmania testovanej látky umožňujú výpočet hmotnostnej bilancie a vyjadrenie výsledkov na základe meraných koncentrácií.

Pridanie testovacích organizmov

25. Štyri až päť dní pred pridaním testovacích organizmov do testovacích nádob sa z kultúr odoberú vajíčkové masy a umiestnia sa do malých nádob s kultivačných médiom. Môže sa použiť staršie médium zo zásobnej kultúry alebo čerstvo pripravené médium. Ak sa použije čerstvo pripravené kultivačné médium, je potrebné doň pridať malé množstvo potravy, napr. zelené riasy a/alebo niekoľko kvapiek filtrátu z jemne rozomletej suspenzie vločkového krmiva pre ryby (pozri dodatok 2). Použijú sa iba čerstvo nakladené vajíčkové masy. Larvy sa zvyčajne začnú liahnuť niekoľko dní po nakladení vajíčok (dva až tri dni v prípade druhu *Chironomus riparius* pri teplote 20 °C a jeden až štyri dni v prípade *Chironomus tentans* pri teplote 23 °C a *Chironomus yoshimatsui* pri teplote 25 °C) a rast lariev prebieha v štyroch instaroch, z ktorých každý trvá štyri až osem dní. V teste sa použijú larvy prvého instaru (dva až tri alebo jeden až štyri dni po vyliahnutí). Instar pakomárov je možné skontrolovať podľa šírky hlavového segmentu (6).

26. Larvy 21. instaru sa pomocou tupej pipety náhodne rozdelia do jednotlivých testovacích nádob obsahujúcich obohatený sediment a vodu. Prevzdušňovanie vody je nutné počas pridávania lariev do testovacích nádob prerušiť a musí byť pozastavené počas ďalších 24 hodín po pridaní lariev (pozri odseky 25 a 32). Podľa použitej koncepcie testu (pozri odseky 19 a 20) je počet lariev použitých pri každej koncentrácii najmenej 60 na odhad bodu EC a 80 na stanovenie koncentrácie NOEC.

Testovacie koncentrácie

27. Pri určovaní rozsahu koncentrácií pre konečný test môže byť užitočný test na zistenie rozsahu. Na tento účel sa použije súbor koncentrácií testovanej látky s veľkými odstupmi. S cieľom zabezpečiť rovnakú hustotu povrchu na pakomára, ktorá sa použije pri konečnom teste, sú pakomáre vystavené každej koncentrácii testovanej látky na obdobie, ktoré umožňuje odhad vhodných testovacích koncentrácií, pričom nie sú potrebné žiadne replikáty.

28. Testovacie koncentrácie pre konečný test sa vyberú na základe výsledkov testu na zistenie rozsahu. Je potrebné použiť a vybrať najmenej päť koncentrácií, ako sa uvádza v odsekoch 18 – 20.

▼M4

Kontroly

29. Súčasťou testu sú kontrolné nádoby bez prítomnosti testovanej látky, ktoré však obsahujú sediment, a primeraný počet replikátov (pozri odseky 19 – 20). Ak sa pri aplikácii testovanej látky použije rozpúšťadlo (pozri odsek 16), je potrebné pridať kontrolu rozpúšťadla v sedimente.

Testovací systém

30. Použijú sa statické systémy. Vo výnimočných prípadoch sa môžu použiť semistatické alebo prietokové systémy s prerušovaným alebo nepretržitým obmieňaním nadložnej vody, napríklad ak sú špecifikácie kvality vody nevhodné pre testovacie organizmy alebo ak ovplyvňujú chemickú rovnováhu (napr. úrovne rozpusteného kyslíka príliš klesnú, koncentrácia vylučovaných produktov príliš stúpne alebo sa zo sedimentu lúhujú minerály, čo má vplyv na pH a/alebo tvrdosť vody). Zvyčajne však postačujú a uprednostňujú sa iné metódy zlepšenia kvality nadložnej vody, ako napríklad prevzdušňovanie.

Potrava

31. Je nevyhnutné larvy kŕmiť podľa možnosti každý deň alebo najmenej trikrát do týždňa. V prvých desiatich dňoch je pre mladé larvy podľa všetkého vhodné krmivo pre ryby (suspenzia vo vode alebo jemne rozomletá potrava, napr. Tetra-Min alebo Tetra-Phyll, bližšie informácie pozri v dodatku 2) v dennom množstve 0,25 – 0,5 mg (0,35 – 0,5 mg pre druh *C. yoshimatsui*) na jednu larvu. Pre staršie larvy môže byť potrebné o niečo väčšie množstvo potravy: denné množstvo 0,5 – 1 mg na jednu larvu by malo po zvyšok testu postačovať. Ak sa pozoruje rast hubovitých organizmov alebo ak sa v kontrolných nádobách pozoruje mortalita, prídel potravy by sa mal vo všetkých testovacích nádobách znížiť a mal by sa kontrolovať. Ak nie je možné vznik hubovitých organizmov zastaviť, test je nutné opakovať. Pri testovaní silno adsorbujúcich látok (napr. s log K_{ow} > 5) alebo látok, ktoré sa kovalentne viažu na sediment, sa môže do umelo pripraveného sedimentu pred stabilizačným obdobím pridať množstvo potravy potrebné na zabezpečenie prežitia a prirodzeného rastu organizmov. Na tento účel sa namiesto krmiva pre ryby musí použiť rastlinný materiál, napr. sa môže pridať 0,5 % (suchá hmotnosť) jemne rozomletých listov napr. pŕhľavy dvojdomej (*Urtica dioica*), moruše (*Morus alba*), ďateliny plazivej (*Trifolium repens*), špenátu (*Spinacia oleracea*) alebo iného rastlinného materiálu (*Cerophyl* alebo alfa celulóza).

Podmienky inkubácie

32. Najlepšie po 24 hodinách od pridania lariev sa zabezpečí jemné prevzdušňovanie nadložnej vody v testovacích nádobách a pokračuje v ňom počas celého testu (treba dbať na to, aby koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesla pod 60 % ASV). Prevzdušňovanie sa zabezpečí pomocou sklenenej Pasteurovej pipety upevnenej 2 – 3 cm nad vrstvou sedimentu (t. j. jedna alebo niekoľko bublín za sekundu). Ak sa testujú prchavé chemikálie, možno zvážiť, že systém sediment – voda sa nebude prevzdušňovať.

33. Test sa vykonáva pri konštantnej teplote 20 °C (± 2 °C). V prípade druhu *C. tentans* sa odporúča teplota 23 °C a v prípade *C. yoshimatsui* 25 °C (± 2 °C). Použije sa 16-hodinová svetlá fáza, pričom intenzita svetla by mala byť 500 – 1 000 luxov.

▼M4

Trvanie expozície

34. Expozícia sa začne pridaním lariev do obohatených a kontrolných nádob. Maximálna dĺžka expozície je 28 dní v prípade druhov *C. riparius* a *C. yoshimatsui* a 65 dní v prípade *C. tentans*. Ak sa pakomáre vykuklia skôr, test sa môže ukončiť najskôr po piatich dňoch po vykuklení posledného dospelého jedinca v kontrolnej skupine.

Pozorovania

Vykuklenie

35. Určí sa čas vývoja a celkový počet úplne vykuklených samčích a samičích pakomárov. Samčeky sa ľahko identifikujú podľa obrvených tykadiel.

36. Testovacie nádoby je potrebné pozorovať najmenej trikrát do týždňa s cieľom vizuálne zhodnotiť každé abnormálne správanie (napr. opúšťanie sedimentu, nezvyčajné plávanie) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Počas obdobia očakávaného vykuklenia je nevyhnutné každý deň spočítať vykuklené pakomáre. Pohlavie a počet úplne vykuklených pakomárov sa zaznamenáva denne. Po identifikácii sa pakomáre vyberú z nádob. Všetky vajíčkové masy nakladené pred ukončením testu sa zaznamenajú a následne odstránia, aby sa predišlo opätovnému zavedeniu lariev do sedimentu. Takisto sa zaznamená počet viditeľných kukiel, ktoré sa nevykuklili. Usmernenie k meraniu vykuklenia je uvedené v dodatku 5.

Rast a prežívanie

37. Ak je potrebné získať údaje o desaťdňovom prežívaní a raste lariev, na začiatku sa pripravia ďalšie testovacie nádoby tak, aby sa mohli následne použiť. Sediment z týchto ďalších nádob sa precedí pomocou cedidla s hrúbkou 250 μm, aby sa zachytili larvy. Kritérium na stanovenie smrti je nehybnosť alebo absencia reakcie na mechanický podnet. Stratené larvy sa takisto počítajú medzi mŕtve (larvy, ktoré uhynuli na začiatku testu, sa mohli rozložiť pôsobením mikróbov). Určí sa suchá hmotnosť (bez popola) lariev, ktoré prežili v každej testovacej nádobe, a vypočíta sa stredná suchá hmotnosť jedincov na jednu nádobu. Je užitočné určiť, do ktorého instaru patria larvy, ktoré prežili. Na toto meranie sa môže použiť šírka hlavového segmentu každého jedinca.

Analytické merania

Koncentrácia testovanej látky

38. Pred začiatkom testu (t. j. pred pridaním lariev) sa pri každom ošetrení z najmenej jednej nádoby odstránia súhrnné vzorky sedimentu na účely analytického stanovenia koncentrácie testovanej látky v sedimente. Odporúča sa, aby sa vzorky nadložnej vody, pórovej vody a sedimentu analyzovali minimálne na začiatku (pozri odsek 24) a na konci testu pri najvyššej koncentrácii a pri jednej nižšej koncentrácii. Tieto skúmania testovanej látky poskytujú informácie o správaní/delení testovanej látky v systéme voda – sediment.

39. Ak sa vykonajú prostredné merania (napr. v deň 7) a ak sú na analýzu potrebné veľké vzorky, ktoré nemožno odobrať z testovacích nádob bez ovplyvnenia testovacieho systému, analytické vyšetrenia je potrebné vykonať na vzorkách z ďalších testovacích nádob, s ktorými sa zaobchádzalo rovnakým spôsobom (vrátane prítomnosti testovacích organizmov), ale ktoré sa nepoužijú na biologické pozorovania.

▼M4

40. Na izolovanie intersticiálnej vody je odporúčaným postupom odstredenie napr. pri 10 000 g a 4 °C počas 30 minút. Ak sa však preukáže, že testovaná látka sa na filtroch neadsorbuje, môže byť prijateľná aj filtrácia. V niektorých prípadoch nemusí byť možné analyzovať koncentrácie v pórovej vode, lebo vzorka je príliš malá.

Fyzikálno-chemické parametre

41. Je potrebné vhodným spôsobom odmerať pH a teplotu v testovacích nádobách (pozri odsek 10). Tvrdosť a amoniak sa merajú v kontrolných nádobách a v jednej testovacej nádobe pri najvyššej koncentrácii na začiatku a na konci testu.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

42. Účelom tohto testu je určiť vplyv testovanej látky na vývojový pomer a celkový počet úplne vykuklených samčích a samičích pakomárov, alebo v prípade desaťdňového testu účinky na prežívanie a hmotnosť lariev. Ak nič nepoukazuje na štatisticky rozdielnu vnímavosť medzi pohlaviami, výsledky pre samčeky a samičky možno na účely štatistických analýz zhrnúť spoločne. Rozdiely vnímavosti medzi pohlaviami sa môžu štatisticky posúdiť napr. tabuľkovým testom $\chi^2 - r \times 2$. Prežívanie lariev a stredná suchá hmotnosť jedincov na jednu nádobu sa podľa potreby musí určiť po desiatich dňoch.

43. Účinné koncentrácie vyjadrené a vychádzajúce zo suchej hmotnosti sa podľa možnosti vypočítajú na základe koncentrácií nameraných v sedimente na začiatku testu (pozri odsek 38).

44. Na vyčíslenie odhadu bodu EC_{50} alebo akejkoľvek inej hodnoty EC_x sa ako pravé replikáty môže použiť štatistika na jednu nádobu. Pri výpočte intervalu spoľahlivosti pre každú hodnotu EC_x je potrebné zohľadniť variabilitu medzi nádobami alebo je nutné preukázať, že táto variabilita je taká malá, že je možné ju ignorovať. Ak sa model upraví metódou najmenších štvorcov, v štatistike na jednu nádobu je potrebné aplikovať transformáciu, aby sa zlepšila homogénnosť rozptylu. Hodnoty EC_x by sa však mali vypočítať po tom, ako sa reakcia transformuje naspäť na pôvodnú hodnotu.

45. Ak je cieľom štatistickej analýzy určenie koncentrácie NOEC/LOEC prostredníctvom testovania hypotézy, je potrebné zohľadniť variabilitu medzi nádobami, napr. pomocou hierarchickej analýzy ANOVA. Alternatívne môžu byť vhodné podrobnejšie testy (21) v prípadoch, keď dochádza k nedodržaniu zvyčajných predpokladov analýzy ANOVA.

Pomer vykuklenia

46. Pomery vykuklenia sú kvantové údaje a môžu sa analyzovať pomocou Cochranovho-Armitageho testu aplikovaného zostupne v prípadoch, keď sa očakáva monotónna reakcia na dávku a tieto údaje zodpovedajú tomuto očakávaniu. Ak to tak nie je, možno použiť Fisherov exaktný test alebo Mantzelov-Haentzalov test s Bonferroniho-Holmovou úpravou hodnôt p. Ak sa medzi replikátmi pri rovnakej koncentrácii preukáže väčšia variabilita, než akú by indikovala binomická distribúcia (často sa uvádza ako „extra-binomická“ variácia), potom by sa mal použiť podrobný Cochranov-Armitageho test alebo Fisherov exaktný test, ako sa navrhuje v bode (21).

▼M4

Určí sa súčet pakomárov vykuklených na jednu nádobu, ne, a vydelí sa počtom zavedených lariev, na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

kde:

ER = pomer vykuklenia,

n_e = počet pakomárov vykuklených na nádobu,

n_a = počet zavedených lariev na nádobu.

47. Najvhodnejšou alternatívou pri veľkých vzorkách v prípadoch extra binomickej variácie je brať pomer vykuklenia (ER) ako nepretržitú reakciu a použiť postupy, ako je napríklad Williamsov test, ak sa očakáva monotónna reakcia na dávku, ktorá je konzistentná s týmito údajmi o ER. Ak reakcia nie je monotónna, je vhodný Dunnettov test. Za veľkú vzorku sa pokladá vzorka, v ktorej je počet vykuklených aj počet nevykuklených jedincov v každom replikáte (nádobe) vyšší ako päť.

48. Pri aplikovaní metód ANOVA je potrebné najskôr transformovať hodnoty ER pomocou arkussínusovej transformácie druhej odmocniny alebo Freemanovej-Tukeyho transformácie s cieľom získať približnú normálnu distribúciu a vyrovnať rozptyly. Cochranov-Armitageho test, Fisherov exaktný (Bonferroniho) test alebo Mantelov-Haenszelov test možno aplikovať, ak sa použijú absolútne frekvencie. Arkussínusová transformácia druhej odmocniny sa aplikuje pomocou prevrátenej hodnoty sínusu ($\sin^{-1}$) druhej odmocniny ER.

49. Pri pomeroch vykuklenia sa hodnoty EC_x vypočítajú pomocou regresnej analýzy (alebo napr. pomocou modelov probit (22), logit, Weibull, vhodného komerčného softvéru atď.). Ak je regresná analýza neúspešná (napr. ak sú k dispozícii menej ako dve čiastkové reakcie), použijú sa iné neparametrické metódy, ako je metóda pohyblivého priemeru alebo jednoduchá interpolácia.

Vývojový pomer

50. Stredný vývojový čas predstavuje stredné časové rozpätie medzi zavedením lariev (deň 0 testu) a vykuklením pokusnej kohorty pakomárov. (Pri výpočte reálneho vývojového času sa zohľadní vek lariev v čase zavedenia). Vývojový pomer je prevrátená hodnota vývojového času (jednotka: 1/deň) a predstavuje časť vývinu lariev, ktorá prebieha za deň. Pri hodnotení týchto štúdií toxicity v sedimente sa uprednostňuje vývojový pomer, lebo jeho rozptyl je nižší a v porovnaní s vývojovým časom je homogénnejší a bližší normálnej distribúcii. Výkonné parametrické testovacie postupy teda možno lepšie použiť s vývojovým pomerom ako s vývojovým časom. Pre vývojový pomer ako nepretržitú reakciu možno hodnoty EC_x odhadnúť pomocou regresnej analýzy [napr. (23), (24)].

51. Pri nasledujúcich štatistických testoch sa predpokladá, že počet pakomárov pozorovaných v kontrolnom dni × sa vykuklil v strednom časovom intervale medzi dňom × a dňom x - l (l = dĺžka kontrolného intervalu, zvyčajne jeden deň). Stredný vývojový pomer na nádobu sa vypočíta podľa tejto rovnice:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

kde:

$\bar{x}$: stredný vývojový pomer na nádobu,

i: index kontrolného intervalu,

m: maximálny počet kontrolných intervalov,

f_i: počet pakomárov vykuklených v kontrolnom intervale i,

n_e: celkový počet pakomárov vykuklených na konci pokusu, ($= \sum f_i$),

x_i: vývojový pomer pakomárov vykuklených v intervale i;

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

kde:

$deň_i$: kontrolný deň (dni od aplikácie),

l_i : dĺžka kontrolného intervalu i (dni, zvyčajne jeden deň).

Správa o teste

52. Správa o teste musí obsahovať aspoň tieto informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter a významné fyzikálno-chemické vlastnosti (rozpustnosť vo vode, tlak pary, rozdeľovací koeficient v pôde (alebo v sedimente, ak je k dispozícii), stabilita vo vode atď.),

— chemické identifikačné údaje (bežný názov, chemický názov, štruktúrálny vzorec, číslo CAS atď.) vrátane čistoty a analytickej metódy kvantifikácie testovanej látky.

Testovacie druhy:

— použité testovacie zvieratá: druh, vedecký názov, zdroj organizmov a podmienky chovu,

— informácie o manipulácii s vajíčkovými masami a larvami,

— vek testovacích zvierat pri umiestnení do testovacích nádob.

Podmienky testovania:

— použitý sediment, t. j. prírodný alebo umelo pripravený sediment,

— v prípade prírodného sedimentu poloha a opis miesta odobratia vzoriek vrátane histórie kontaminácie, ak je to možné, charakteristiky: pH, obsah organického uhlíka, pomer C/N a granulometria (podľa potreby),

— príprava umelo pripraveného sedimentu: zložky a charakteristiky (obsah organického uhlíka, pH, vlhkosť atď. na začiatku testu),

— príprava testovacej vody (ak sa použije rekonštituovaná voda) a charakteristiky (koncentrácia kyslíka, pH, vodivosť, tvrdosť atď. na začiatku testu),

— výška sedimentu a nadložnej vody,

— objem nadložnej a pórovej vody, hmotnosť mokrého sedimentu s pórovou vodou a bez nej,

▼M4

— testovacie nádoby (materiál a veľkosť),

— metóda obohatenia sedimentu: použité testovacie koncentrácie, počet replikátov a prípadné použitie rozpúšťadiel,

— rovnovážna fáza stabilizácie systému obohatený sediment – voda: trvanie a podmienky,

— inkubačné podmienky: teplota, svetelný cyklus a intenzita, prevdzušňovanie (frekvencia a intenzita),

— podrobné informácie o kŕmení vrátane druhu potravy, prípravy, množstva a kŕmneho režimu.

Výsledky:

— nominálne testovacie koncentrácie, namerané testovacie koncentrácie a výsledky všetkých analýz na stanovenie koncentrácie testovanej látky v testovacej nádobe,

— kvalita vody v testovacích nádobách, t. j. pH, teplota, rozpustený kyslík, tvrdosť a amoniak,

— kompenzácia prípadnej vyparenej testovacej vody,

— počet vykuklených samčích a samičích pakomárov na nádobu na deň,

— počet lariev na nádobu, ktoré sa nevykuklili,

— stredná suchá hmotnosť jednotlivých lariev na nádobu a na instar podľa potreby,

— percentuálne vykuklenie na replikát a testovaciu koncentráciu (samčie a samičie pakomáre spolu),

— stredný vývojový pomer úplne vykuklených pakomárov na replikát a miera ošetrenia (samčie a samičie pakomáre spolu),

— odhady toxických parametrov, napr. ECx (a súvisiace intervaly spoľahlivosti), NOEC a/alebo LOEC a štatistické metódy použité na ich stanovenie,

— rozbor výsledkov vrátane každého vplyvu na výsledok testu vyplývajúceho z odchýlok od tejto testovacej metódy.

LITERATÚRA

1. BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Upravili M. Streloke a H.Köpp. Berlín 1995.

2. Fleming, R. a kol. (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Záverečná správa pre Európsku komisiu. Správa č.: EK, 3738. August 1994. WRc, UK.

3. SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Zo seminára WOSTA, ktorý sa uskutočnil v Holandsku.

4. ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. s. 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. Druhé vydanie. EPA 600/R-99/064. Marec 2000. Revízia prvého vydania z júna 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, K. E., McLeay, D. J., a Kirby, R. S. (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, Kanada.

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. Testovacia metóda C.8 tejto prílohy, Toxicita pre dážďovky.

15. Suedel, B. C., a Rodgers, J. H. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163 – 1175.

16. Naylor, C., a Rodrigues, C. (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291 – 3303.

17. Dunnett, C. W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096 – 1121.

18. Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482 – 491.

19. 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.

20. Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510 – 531.

21. Rao, J. N. K., a Scott, A. J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577 – 585.

22. Christensen, E. R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213 – 221.

23. Bruce a 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**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Na účely tejto testovacej metódy sa používajú tieto vymedzenia pojmov:

Umelo pripravený sediment alebo rekonštituovaný, umelý alebo syntetický sediment, je zmes materiálov použitých na napodobnenie fyzických zložiek prírodného sedimentu.

Nadložná voda je voda umiestnená v testovacej nádobe nad sedimentom.

Intersticiálna voda alebo pórová voda je voda nachádzajúca sa v priestore medzi časticami sedimentu a pôdy.

Obohatený sediment je sediment, do ktorého bola pridaná testovaná látka.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M4

Dodatok 2

Odporúčania ku kultúre *Chironomus riparius*

1. Larvy rodu *Chironomus* sa môžu chovať v kryštalizačných miskách alebo vo väčších nádobách. Na dno nádoby sa nanesie tenká vrstva jemného kremenného piesku vo výške 5 – 10 mm. Je preukázané, že vhodným substrátom je aj diatomit (napr. Merck, článok 8117) (postačuje tenšia vrstva do výšky len niekoľkých milimetrov). Potom sa pridá vhodná voda do výšky niekoľkých centimetrov. Hladiny vody by sa mali podľa potreby dopĺňať, aby sa kompenzovala strata vyparením a aby sa predišlo vysychaniu. Vodu je možné v prípade potreby vymeniť. Je potrebné zabezpečiť jemné prevzdušňovanie. Misky na chov lariev by mali byť umiestnené vo vhodnej klietke, ktorá zabráni úniku vykuklených dospelých jedincov. Klietka by mala byť dostatočne veľká, aby umožňovala rojenie vykuklených dospelých jedincov, v opačnom prípade by nemuselo dôjsť ku kopulácii (minimálna veľkosť je asi 30 × 30 × 30 cm).

2. Klietky je potrebné udržiavať pri izbovej teplote alebo v miestnosti so stálym prostredím pri teplote 20 ± 2 °C so svetlou fázou v trvaní 16 hodín (intenzita asi 1 000 luxov) a fázou tmy v trvaní 8 hodín. Je preukázané, že vlhkosť vzduchu nižšia ako 60 % RH môže brániť reprodukcii.

Riediaca voda

3. Možno použiť akúkoľvek vhodnú prírodnú alebo syntetickú vodu. Bežne sa používa studňová voda, odchlórovaná voda z vodovodu a umelé médiá (napr. Elendtovo médium „M4“ alebo „M7“, pozri ďalej). Pred použitím je potrebné vodu prevzdušniť. V prípade potreby možno kultivačnú vodu obnoviť opatrným odliatím alebo odčerpaním použitej vody z kultivačných nádob bez toho, aby sa poškodili trubice lariev.

Kŕmenie lariev

4. Larvy rodu *Chironomus* sa kŕmia vločkovým krmivom pre ryby [Tetra Min®, Tetra Phyll® alebo iná podobná značka patentovaného krmiva pre ryby] približným množstvom 250 mg na nádobu na deň. Krmivo sa môže podávať ako suchý rozomletý prášok alebo ako suspenzia vo vode: 1,0 g vločkového krmiva sa pridá do 20 ml riediacej vody a premieša sa, aby sa získala homogénna zmes. Tento prípravok sa môže podávať v množstve približne 5 ml na nádobu na deň (pred použitím pretrepať). Staršie larvy môžu dostávať viac.

5. Kŕmenie sa upraví podľa kvality vody. Ak sa kultivačné médium zakalí, kŕmenie je potrebné obmedziť. Prídavky do krmiva sa musia starostlivo monitorovať. Nedostatok potravy spôsobí, že larvy sa budú presúvať k vodnému stĺpcu, a prebytok potravy spôsobí zvýšenie činnosti mikróbov a zníženie koncentrácií kyslíka. V obidvoch prípadoch môže dôjsť k zníženiu rastových pomerov.

6. Pri založení nových kultivačných nádob sa môžu pridať aj bunky niektorých zelených rias (napr. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

Kŕmenie vykuklených dospelých jedincov

7. Z niektorých pokusov vyplýva, že ako potrava pre vykuklené dospelé jedince môže slúžiť vatový tampón napustený nasýteným sacharózovým roztokom.

▼M4

Vykuklenie

8. Pri teplote 20 ± 2 °C sa dospelé jedince začnú kukliť z nádoby na chov lariev po približne 13 – 15 dňoch. Samčeky sa ľahko rozlíšia podľa obrvených tykadiel.

Vajíčkové masy

9. Keď sú v chovnej klietke prítomné dospelé jedince, vo všetkých nádobách na chov lariev je potrebné trikrát do týždňa kontrolovať kladenie želatínových vajíčkových más. Ak sú vajíčkové masy prítomné, opatrne sa odoberú. Mali by sa preniesť na malú misku so vzorkou kultivačnej vody. Vajíčkové masy sa použijú na založenie nových kultivačných nádob (napr. dve až štyri vajíčkové masy na nádobu) alebo sa použijú v testoch toxicity.

10. Larvy prvého instaru by sa mali vyliahnuť po dvoch až troch dňoch.

Založenie nových kultivačných nádob

11. Po vytvorení kultúr by malo byť možné založiť novú nádobu na kultiváciu lariev každý týždeň alebo menej často v závislosti od testovacích požiadaviek, pričom staršie nádoby sa po vykuklení dospelých pakomárov odstránia. Týmto spôsobom sa pri minimálnom riadení zabezpečí pravidelné dopĺňanie dospelých jedincov.

Príprava testovacích roztokov „M4“ a „M7“

12. Elendt (1990) opísal médium „M4“. Médium „M7“ sa pripravuje ako médium „M4“ s výnimkou látok označených v tabuľke 1, pre ktoré sú koncentrácie v médiu „M7“ štyrikrát nižšie ako v médiu „M4“. Publikácia o médiu „M7“ je v štádiu prípravy (Elendt, osobná komunikácia). Testovací roztok by sa nemal pripraviť podľa Elendta a Biasa (1990), lebo koncentrácie $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 a K_2HPO_4 uvedené pre prípravu zásobných roztokov nie sú vhodné.

Príprava média „M7“

13. Každý zásobný roztok (I) sa pripraví jednotlivo a kombinovaný zásobný roztok (II) sa pripraví z týchto zásobných roztokov (I) (pozri tabuľku 1). Na prípravu média „M7“ sa 50 ml z kombinovaného zásobného roztoku (II) a množstvá každého makronutričného zásobného roztoku uvedené v tabuľke 2 doplnia do jedného litra deionizovanej vody. Vitamínový zásobný roztok sa pripraví pridaním troch vitamínov do deionizovanej vody, ako je uvedené v tabuľke 3, a krátko pred použitím sa do konečného média „M7“ pridá 0,1 ml kombinovaného vitamínového zásobného roztoku. (Vitamínový zásobný roztok sa skladuje zmrazený v malých alikvotných častiach.) Médium sa prevzdušňuje a stabilizuje.

LITERATÚRA

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Upravili M. Streloke a H.Köpp. Berlín 1995.

▼**M4**

Tabuľka 1

Zásobné roztoky stopových prvkov pre médiá M4 a M7

Zásobné roztoky (I)	Množstvo (mg) doplnené do jedného litra deionizovanej vody	Na prípravu kombinovaného zásobného roztoku (II) sa zmiešajú tieto množstvá (ml) zásobných roztokov (I) a doplnia sa do jedného litra deionizovanej vody		Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch (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) Tieto látky sa líšia v M4 a M7, ako je uvedené vyššie.
(2) Tieto roztoky sa pripravia jednotlivo, potom sa zlejú dokopy a okamžite sa autoklávujú.

Tabuľka 2

Makronutričné zásobné roztoky pre médiá M4 a M7

	Množstvo doplnené do jedného litra deionizovanej vody (mg)	Množstvo pridaných makronutričných zásobných roztokov pri príprave médií M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch M4 a 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**

Tabuľka 3

Vitamínový zásobný roztok pre médiá M4 a M7. Všetky tri vitamínové roztoky sa skombinujú, aby sa vytvoril jeden vitamínový zásobný roztok.

	Množstvo doplnené do jedného litra deionizovanej vody (mg)	Množstvo pridaného vitamínového zásobného roztoku pri príprave médií M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch M4 a M7 (mg/l)
Tiamín hydrochlorid	750	0,1	0,075
Kyanokobalamín (B12)	10	0,1	0,0010
Biotín	7,5	0,1	0,00075

LITERATÚRA

Elendt, B. P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25 – 33.

Elendt, B. P., a 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

Dodatok 3

PRÍPRAVA UMELO PRIPRAVENÉHO SEDIMENTU

Zloženie sedimentu

Zloženie umelo pripraveného sedimentu by malo byť takéto:

Zložka	Charakteristika	% suchej hmotnosti sedimentu
Rašelina	Rašelinníková rašelina, pH čo najbližšie k 5,5 – 6,0, bez viditeľných zvyškov rastlín, jemne rozomletá (veľkosť častíc ≤ 1 mm) a usušená vzduchom	4 – 5
Kremenný piesok	Veľkosť zrniek: > 50 % častíc by malo mať veľkosť v rozsahu 50 – 200 μm	75 – 76
Kaolín	Obsah kaolinitu ≥ 30 %	20
Organický uhlík	Upravený pridaním rašeliny a piesku	2 (± 0,5)
Uhličitan vápenatý	$CaCO_3$, rozomletý na prach, chemicky čistý	0,05 - 0,1
Voda	Vodivosť ≤ 10 μS/cm	30 - 50

Príprava

Rašelina sa usuší vzduchom a rozomelie na jemný prášok. V deionizovanej vode sa pomocou vysokovýkonného homogenizačného prístroja pripraví suspenzia požadovaného množstva rašelinového prášku. Hodnota pH tejto suspenzie sa upraví na 5,5 ± 0,5 pomocou $CaCO_3$. Suspenzia sa aspoň na dva dni uvedie do podmienok jemným premiešavaním pri teplote 20 ± 2 °C, aby sa stabilizovala hodnota pH a vytvorila stabilná mikrobiálna zložka. Opäť sa zmeria pH, ktoré by malo byť na úrovni 6,0 ± 0,5. Rašelinová suspenzia sa následne zmieša s ostatnými zložkami (piesok a kaolín) a s deionizovanou vodou, aby sa získal homogénny sediment s obsahom vody v rozsahu 30 - 50 percent suchej hmotnosti sedimentu. Znova sa zmeria hodnota pH konečnej zmesi a podľa potreby sa pomocou $CaCO_3$ upraví na 6,5 – 7,5. Odoberú sa vzorky sedimentu, aby sa určila suchá hmotnosť a obsah organického uhlíka. Následne sa odporúča, aby sa pred použitím v teste toxicity pri pakomároch umelo pripravený sediment uviedol na sedem dní do rovnakých podmienok, aké budú prevládať v nasledujúcom teste.

Skladovanie

Suché zložky na prípravu umelého sedimentu sa môžu skladovať na suchom a chladnom mieste pri izbovej teplote. Umelo pripravený (mokrý) sediment by sa pred použitím v teste nemal skladovať. Mal by sa použiť hneď po sedemdňovom období uvádzania do podmienok, ktorým sa končí jeho príprava.

LITERATÚRA

Kapitola C.8 tejto prílohy. Toxicita pre dážďovky.

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**

Dodatok 4

Chemické charakteristiky prijateľnej riediacej vody

Látka	Koncentrácie
Pevné častice	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Tvrdosť ako $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Zostatkový chlór	< 10 µg/l
Celkové organofosfátové pesticídy	< 50 ng/l
Celkové organochlórované pesticídy plus polychlórované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlór	< 25 ng/l

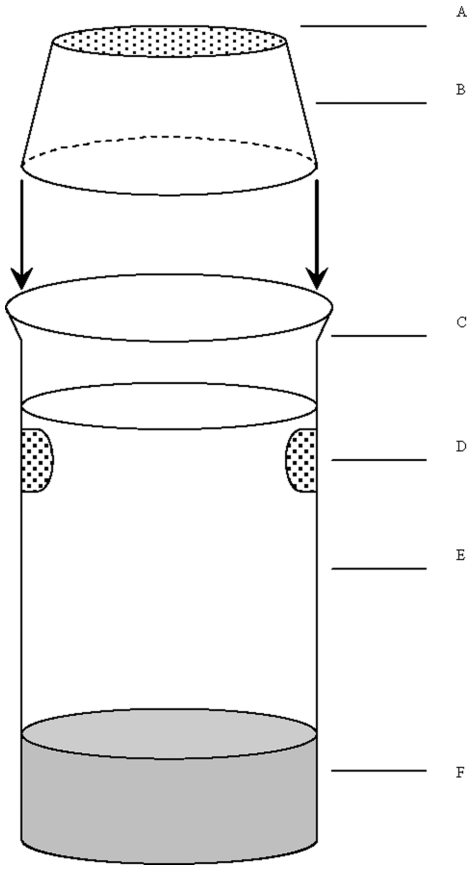
(*) Treba však poznamenať, že ak existuje podozrenie na interakciu medzi iónmi tvrdosti a testovanou látkou, mala by sa použiť voda s nižšou tvrdosťou (a v takom prípade sa teda nesmie použiť Elendtovo médium M4).

▼**M4**

Dodatok 5

Usmernenie k monitorovaniu vykuklenia lariev pakomárov

Na testovacie kadičky sa umiestnia pasce na vykuklené jedince. Tieto pasce sú potrebné odo dňa 20 do skončenia testu. Ďalej je znázornený príklad použitej pasce.



A: nylonová sieťka

B: prevrátené umelohmotné misky

C: expozičná kadička bez okraja

D: sieťované otvory na výmenu vody

E: voda

F: sediment

▼M4

C. 28. TEST TOXICITY CHIRONOMIDAE V SYSTÉME SEDIMENT – VODA ZA POUŽITIA OBOHATENEJ VODY

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s OECD TG 219 (2004). Táto testovacia metóda bola vypracovaná s cieľom hodnotiť účinky predĺženého pôsobenia chemikálií na vodné larvy dvojkrídlovcov rodu *Chironomus* žijúce v sedimente. Vychádza najmä z usmernenia BBA, ktoré používa testovací systém sediment – voda s umelou pôdou a expozičným scenárom vo vodnom stĺpci (1). Zohľadňuje aj existujúce protokoly o testoch toxicity na *Chironomus riparius* a *Chironomus tentans*, ktoré boli vypracované v Európe a Severnej Amerike (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) a boli podrobené kruhovým testom (1) (6) (9). Môžu sa použiť aj iné dobre zdokumentované druhy pakomárov, napr. *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. Expozičný scenár použitý v tejto testovacej metóde je obohacovanie vody. Výber vhodného expozičného scenára závisí od plánovaného použitia testu. Vodný expozičný scenár zahŕňajúci obohatenie vodného stĺpca je určený na simuláciu prípadu pesticídneho postreku a zahŕňa počiatočné maximálne koncentrácie v pórovej vode. Je užitočný aj pri iných druhoch expozície (vrátane chemických únikov) s výnimkou akumulačných procesov, ktoré trvajú dlhšie ako testovacie obdobie.

3. Látky, ktoré je potrebné testovať na organizmoch žijúcich v sedimente, zvyčajne pretrvajú v tomto kompartmente dlhý čas. Organizmy žijúce v sedimente môžu byť exponované viacerými spôsobmi. Relatívny význam každého spôsobu expozície a časové obdobie, v ktorom sa každý z nich podieľa na celkových toxických účinkoch, závisí od fyzikálno-chemických vlastností danej chemikálie. V prípade silno adsorbujúcich látok (napr. s log K_{ow} > 5) alebo látok, ktoré sa kovalentne viažu na sediment, môže byť významným spôsobom expozície prijímanie kontaminovanej potravy. S cieľom vyhnúť sa podhodnoteniu toxicity vysokolipofilných látok možno zvážiť použitie potravy pridanej do sedimentu pred aplikáciou testovanej látky. S cieľom zohľadniť všetky potenciálne spôsoby expozície sa táto testovacia metóda zameriava na dlhodobú expozíciu. Trvanie testu je v rozsahu 20 – 28 dní v prípade druhov *C. riparius* a *C. yoshimatsui* a 28 – 65 dní pri *C. tentans*. Ak sú na špecifické účely potrebné krátkodobé údaje, napríklad s cieľom skúmať účinky nestabilných chemikálií, môžu sa po desiatich dňoch odstrániť ďalšie replikáty.

4. Meranými parametrami sú celkový počet vykuklených dospelých jedincov a čas do vykuklenia. Ak sú potrebné ďalšie krátkodobé údaje, odporúča sa vykonať merania prežitia a rastu lariev až po desiatich dňoch s použitím ďalších replikátov podľa potreby.

5. Odporúča sa použiť umelo pripravený sediment. Umelo pripravený sediment má oproti prírodným sedimentom niekoľko výhod:

— zníži sa variabilita testu, lebo umelo pripravený sediment vytvára reprodukovateľnú „štandardizovanú matricu“, a odstráni sa potreba nájsť nekontaminované a čisté zdroje sedimentu,

— testy je možné začať kedykoľvek bez problému sezónnej variability v testovanom sedimente a nie je potrebné sediment predpripraviť, aby sa odstránila pôvodná fauna. Použitie umelo pripraveného sedimentu takisto znižuje náklady spojené s odberom dostatočných množstiev sedimentu v teréne na rutinné testovanie,

▼M4

— použitie umelo pripraveného sedimentu umožňuje porovnanie toxicity a následné zatriedenie látok: údaje o toxicite z testov s prírodnými a umelými sedimentmi boli v prípade viacerých chemikálií porovnateľné (2).

6. Vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

7. Larvy pakomárov v prvom instare sú exponované rozsahu koncentrácií testovanej látky v systémoch sediment – voda. Test sa začne umiestnením lariev v prvom instare do testovacích kadičiek obsahujúcich systém sediment – voda a následne obohatením vody testovanou látkou. Na konci testu sa meria vykuklenie pakomárov a vývojový pomer. Podľa potreby sa môže po desiatich dňoch merať aj prežitie a hmotnosť lariev (pomocou ďalších replikátov podľa potreby). Tieto údaje sa analyzujú buď prostredníctvom regresného modelu na odhadnutie koncentrácie, ktorá by spôsobila x % pokles vo vykuklení, prežívaní lariev alebo raste (napr. EC_{15}, EC_{50} atď.), alebo prostredníctvom testovania štatistickej hypotézy na stanovenie koncentrácie NOEC/LOEC. Pri druhom spôsobe je potrebné pomocou štatistických testov porovnať hodnoty účinkov s kontrolnými hodnotami.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

8. Je potrebné poznať rozpustnosť testovanej látky vo vode, jej tlak pary, namerané alebo vypočítané delenie na sediment a stabilitu vo vode a v sedimente. Mala by byť k dispozícii spoľahlivá analytická metóda so známou a zdokumentovanou presnosťou a detekčným limitom na kvantifikáciu testovanej látky v nadložnej vode, pórovej vode a sedimente. Medzi užitočné informácie patrí štrukturálny vzorec a čistota testovanej látky. Užitočnou informáciou je aj chemický osud testovanej chemikálie (napr. rozptýlenie, abiotická a biotická degradácia atď.). Ďalšie informácie pre testované látky s fyzikálno-chemickými vlastnosťami, ktoré sťažujú ich testovanie, sú uvedené v odkaze (12).

REFERENČNÉ CHEMIKÁLIE

9. Referenčné chemikálie sa môžu testovať pravidelne ako prostriedok na zabezpečenie spoľahlivosti testovacieho protokolu a testovacích podmienok. Príkladmi referenčných toxických látok, ktoré sa úspešne používajú v kruhových testoch a overovacích štúdiách, sú: lindán, trifluralín, pentachlórfenol, chlorid kademnatý a chlorid draselný (1) (2) (5) (6) (13).

PLATNOSŤ TESTU

10. Aby bol test platný, musí spĺňať tieto podmienky:

— vykuklenie v kontrolných skupinách musí byť na konci testu na úrovni minimálne 70 % (1) (6),

— vykuklenie druhov *C. riparius* a *C. yoshimatsui* na dospelé jedince z kontrolných nádob by malo nastať 12 – 23 dní po ich vložení do nádob. V prípade druhu *C. tentans* je potrebné obdobie 20 – 65 dní,

— na konci testu je potrebné zmerať v každej nádobe pH a koncentráciu rozpusteného kyslíka. Koncentrácia kyslíka by pri použitej teplote mala predstavovať najmenej 60 % saturačnej hodnoty vzduchom (ASV) a hodnota pH nadložnej vody by vo všetkých testovacích nádobách mala byť v rozmedzí 6 – 9,

▼M4

— teplota vody by sa nemala líšiť o viac ako ± 1,0 °C. Teplotu vody je možné kontrolovať pomocou izotermickej komory a v tom prípade je potrebné v primeraných časových intervaloch potvrdiť teplotu v komore.

OPIS METÓDY

Testovacie nádoby

11. Štúdia sa vykonáva v sklenených kadičkách s objemom 600 ml a s priemerom 8 cm. Sú vhodné aj iné nádoby, ale musia zaručiť vhodnú hĺbku nadložnej vody a sedimentu. Povrch sedimentu by mal byť dostatočne veľký, aby poskytoval 2 – 3 cm^2 priestoru na larvu. Pomer hĺbky vrstvy sedimentu k hĺbke nadložnej vody by mal byť 1: 4. Testovacie nádoby a iné prístroje, ktoré prichádzajú do styku s testovacím systémom, by mali byť vyrobené výlučne zo skla alebo iného chemicky inertného materiálu (napr. teflónu).

Výber druhov

12. Uprednostňovaným druhom na použitie v teste je *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* je takisto vhodný, ale je náročnejší na starostlivosť a vyžaduje si dlhšie trvanie testu. Možno použiť aj *Chironomus yoshimatsui*. Podrobné informácie o kultivačných metódach v prípade druhu *Chironomus riparius* sú uvedené v dodatku 2. Informácie o kultivačných podmienkach sú k dispozícii aj pre iné druhy, t. j. *Chironomus tentans* (4) a *Chironomus yoshimatsui* (11). Identifikácia druhov musí byť pred testovaním potvrdená, ale nevyžaduje sa pred každým testom, ak organizmy pochádzajú z internej kultúry.

Sediment

13. Uprednostňuje sa použitie umelo pripraveného sedimentu (známeho aj pod názvom rekonštituovaný, umelý alebo syntetický sediment). Ak sa však použije prírodný sediment, je potrebné ho charakterizovať (aspoň pH, obsah organického uhlíka, odporúča sa aj stanovenie ostatných parametrov ako pomer C/N a granulometria) a nemal by obsahovať žiadne kontaminanty ani iné organizmy, ktoré by mohli s pakomármi súperiť alebo ich požierať. Takisto sa odporúča, aby bol prírodný sediment pred použitím v teste toxicity pri pakomároch na sedem dní uvedený do podmienok, ktoré budú prevládať v nasledujúcom teste. V tomto teste (1) (15) (16) sa odporúča použiť nasledujúci umelo pripravený sediment založený na umelej pôde použitej v testovacej metóde C.8 (14):

a) 4 – 5 % (suchá hmotnosť) rašeliny: čo najbližšie k pH 5,5 – 6,0. Je dôležité použiť rašelinu v práškovej forme, jemne rozomletú (veľkosť častíc ≤ 1 mm) a sušenú iba vzduchom;

b) 20 % (suchá hmotnosť) kaolínu (obsah kaolinitu podľa možnosti nad 30 %);

c) 75 – 76 % (suchá hmotnosť) kremenného piesku (mal by prevládať jemný piesok s viac ako 50 % častíc s veľkosťou od 50 do 200 μm);

d) deionizovaná voda sa pridá, aby sa dosiahla vlhkosť konečnej zmesi v rozsahu 30 – 50 %;

e) uhličitan vápenatý chemicky čistej kvality ($CaCO_3$) sa pridá, aby sa pH konečnej zmesi sedimentu upravila na 7,0 ± 0,5;

f) obsah organického uhlíka v konečnej zmesi by mal byť 2 % (± 0,5 %) a je potrebné ho upraviť pomocou primeraného množstva rašeliny a piesku podľa písmen a) a c).

▼M4

14. Zdroj rašeliny, kaolínu a piesku by mal byť známy. Je potrebné skontrolovať, či zložky sedimentu neobsahujú chemické kontaminanty (napr. ťažké kovy, organochlórové zlúčeniny, organofosforové zlúčeniny atď.). Príklad prípravy umelo pripraveného sedimentu je uvedený v dodatku 3. Miešanie suchých zložiek je takisto prípustné, ak sa preukáže, že po pridaní nadložnej vody nedochádza k separácii zložiek sedimentu (napr. k vyplaveniu častíc rašeliny) a že rašelina alebo sediment sú v dostatočnej miere uvedené do podmienok.

Voda

15. Každá voda, ktorá vyhovuje chemickým charakteristikám prijateľnej riediacej vody podľa zoznamu uvedeného v dodatkoch 2 a 4, je vhodná ako testovacia voda. Každá vhodná voda, prírodná voda (povrchová alebo podzemná voda), rekonštituovaná voda (pozri dodatok 2) alebo odchlórovaná voda z vodovodu sú prijateľné ako voda na kultiváciu a testovacia voda, ak v nej pakomáre prežijú počas celej kultivácie a testovania bez príznakov stresu. Na začiatku testu by pH testovacej vody mala mať hodnotu medzi 6 a 9 a celková tvrdosť by nemala byť vyššia ako 400 mg/l pre $CaCO_3$. Ak však existuje podozrenie na interakciu medzi iónmi tvrdosti a testovanou látkou, mala by sa použiť voda s nižšou tvrdosťou (a v takom prípade sa teda nesmie použiť Elendtovo médium M4). Počas celej štúdie by sa mal používať rovnaký druh vody. Charakteristiky kvality vody uvedené v dodatku 4 by sa mali merať najmenej dvakrát za rok, alebo ak existuje podozrenie, že sa tieto charakteristiky mohli významne zmeniť.

Zásobné roztoky – obohatená voda

16. Testovacie koncentrácie sa vypočítajú na základe koncentrácií vo vodnom stĺpci, t. j. vody nad sedimentom. Testovacie roztoky vybratých koncentrácií sa zvyčajne pripravujú zriedením zásobného roztoku. Zásobné roztoky sa podľa možnosti pripravujú rozpustením testovanej látky v testovacom médiu. V niektorých prípadoch môže byť na vytvorenie vhodne koncentrovaného zásobného roztoku potrebné použiť rozpúšťadlá alebo disperzné činidlá. Príkladmi vhodných rozpúšťadiel sú acetón, etanol, metanol, etylénglykolmonoetyléter, etylénglykoldimetyléter, dimetylformamid a trietylénglykol. Ako disperzné činidlá možno použiť Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % metylcelulózu a HCO-40. Koncentrácia látky zvyšujúcej rozpustnosť v konečnom testovacom médiu by mala byť minimálna (t. j. ≤ 0,1 ml/l) a mala by byť vo všetkých pokusoch rovnaká. Ak sa použije látka zvyšujúca rozpustnosť, nesmie mať žiadne signifikantné účinky na prežívanie ani žiaden viditeľný škodlivý účinok na larvy pakomárov, aké sa preukázali pri kontrole s rozpúšťadlom. Je však potrebné vynaložiť maximálne úsilie, aby sa predišlo použitiu týchto materiálov.

KONCEPCIA TESTU

17. Koncepcia testu sa vzťahuje na výber počtu a odstup testovaných koncentrácií, počet nádob pri každej koncentrácii a počet lariev v každej nádobe. Sú tu opísané koncepcie na odhadnutie bodu EC, na odhadnutie koncentrácie NOEC a na vykonanie limitného testu. Uprednostňuje sa regresná analýza pred testovaním hypotéz.

Koncepcia regresnej analýzy

18. Účinná koncentrácia (napr. EC_{15}, EC_{50}) a koncentračný rozsah, v ktorom sa skúmajú účinky testovanej látky, sa merajú koncentráciami zahrnutými do testu. Vo všeobecnosti sú presnosť a najmä platnosť, s ktorou možno odhadovať účinné koncentrácie (EC_x), lepšie, ak je účinná koncentrácia v rozsahu

▼M4

testovaných koncentrácií. Je potrebné vyhýbať sa extrapolácii hlboko pod najnižšou pozitívnou koncentráciou alebo nad najvyššou koncentráciou. Pri výbere rozsahu koncentrácií, ktoré sa použijú, je užitočný predbežný test na zistenie rozsahu (pozri odsek 27).

19. Ak je potrebné odhadnúť EC_x, malo by sa testovať najmenej päť koncentrácií a tri replikáty pre každú koncentráciu. V každom prípade je vhodné použiť dostatočné testovacie koncentrácie, ktoré umožnia dobrý modelový odhad. Faktor medzi koncentráciami by nemal byť väčší ako 2 (v prípadoch, keď má krivka závislosti reakcie od dávky plytký sklon, možno urobiť výnimku). Počet replikátov pri každej aplikácii sa môže znížiť, ak sa zvýši počet testovacích koncentrácií s rozdielnymi reakciami. Zvýšenie počtu replikátov alebo skrátenie dĺžky intervalov testovacích koncentrácií zvyčajne vedie k nižším intervalom spoľahlivosti testu. Ak sa odhaduje desaťdňové prežívanie a rast lariev, sú potrebné ďalšie replikáty.

Koncepcia odhadu NOEC/LOEC

20. Ak sa odhadujú koncentrácie NOEC/LOEC, použije sa päť testovacích koncentrácií s najmenej štyrmi replikátmi a faktor medzi koncentráciami by nemal byť vyšší ako dva. Počet replikátov by mal byť dostatočný, aby sa zabezpečila primeraná štatistická výpovedná hodnota na zistenie rozdielu 20 % pri kontrole pri úrovni významnosti 5 % ($p = 0,05$). V prípade vývojového pomeru je zvyčajne vhodná analýza rozptylu (ANOVA), ako napríklad Dunnettov test a Williamsov test (17) (18) (19) (20). Pri pomere vykuklenia možno použiť Cochranov-Armitageho, Fisherov exaktný (s Bonferroniho korekciou) alebo Mantelov-Haenszelov test.

Limitný test

21. Môže sa vykonať limitný test (jedna testovaná koncentrácia a kontrola), ak v predbežnom teste na zistenie rozsahu neboli pozorované žiadne účinky. Účelom limitného testu je ukázať, že toxická hodnota testovanej látky je väčšia ako testovaná limitná koncentrácia. V tejto testovacej metóde nemožno navrhnúť odporúčanú koncentráciu. Toto rozhodnutie je na posúdení regulačného orgánu. Zvyčajne je na aplikáciu aj kontrolu potrebných najmenej šesť replikátov. Je nutné preukázať primeranú štatistickú výpovednú hodnotu na zistenie rozdielu 20 % pri kontrole pri úrovni významnosti 5 % ($p = 0,05$). V prípade metrickej reakcie (vývojový pomer a hmotnosť) je vhodnou štatistickou metódou t-test, pokiaľ údaje spĺňajú požiadavky tohto testu (normalita, homogénne rozptyly). Ak tieto požiadavky nie sú splnené, môže sa použiť t-test nerovnomerných rozptylov alebo neparametrický test, ako napríklad Wilcoxonov-Mannov-Whitheyho test. Pri pomere vykuklenia je vhodný Fisherov exaktný test.

POSTUP

Podmienky expozície

Príprava systému obohatená voda – sediment

22. Do testovacích nádob sa pridajú primerané množstvá umelo pripraveného sedimentu (pozri odseky 13 – 14 a dodatok 3), aby sa vytvorila vrstva hrubá najmenej 1,5 cm. Voda sa pridá do výšky 6 cm (pozri odsek 15). Pomer výšky vrstvy sedimentu a výšky vody by nemal presiahnuť 1: 4, pričom vrstva sedimentu by nemala byť hrubšia ako 3 cm. Systém sediment – voda by sa mal pred pridaním testovacích organizmov nechať jemne prevzdušňovať počas siedmich dní (pozri odsek 14 a dodatok 3). S cieľom zabrániť separácii zložiek sedimentu a resuspendovaniu jemného materiálu počas pridávania testovacej vody do vodného stĺpca môže byť sediment v čase, keď sa naň nalieva voda, prikrytý umelohmotným kotúčom, ktorý sa hneď potom odstráni. Môže byť vhodné aj použitie iných prístrojov.

▼M4

23. Testovacie nádoby sa zakryjú (napr. sklenenými platňami). V prípade potreby sa počas štúdie dopĺňajú hladiny vody na pôvodný objem s cieľom kompenzovať vyparovanie vody. Na tento účel sa použije destilovaná alebo deionizovaná voda, aby sa predišlo hromadeniu solí.

Pridanie testovacích organizmov

24. Štyri až päť dní pred pridaním testovacích organizmov do testovacích nádob sa z kultúr odoberú vajíčkové masy a umiestnia sa do malých nádob s kultivačných médiom. Môže sa použiť staršie médium zo zásobnej kultúry alebo čerstvo pripravené médium. Ak sa použije čerstvo pripravené kultivačné médium, je potrebné doň pridať malé množstvo potravy, napr. zelené riasy a/alebo pár kvapiek filtrátu z jemne rozomletej suspenzie vločkového krmiva pre ryby (pozri dodatok 2). Použijú sa iba čerstvo nakladené vajíčkové masy. Larvy sa zvyčajne začnú liahnuť niekoľko dní po nakladení vajíčok (dva až tri dni v prípade druhu *Chironomus riparius* pri teplote 20 °C a jeden až štyri dni v prípade *Chironomus tentans* pri teplote 23 °C a *Chironomus yoshimatsui* pri teplote 25 °C) a rast lariev prebieha v štyroch instaroch, z ktorých každý trvá štyri až osem dní. V teste sa použijú larvy prvého instaru (dva až tri alebo jeden až štyri dni po vyliahnutí). Instar pakomárov je možné skontrolovať podľa šírky hlavového segmentu (6).

25. Larvy 21. instaru sa pomocou tupej pipety náhodne rozdelia do jednotlivých testovacích nádob obsahujúcich obohatený sediment a vodu. Prevzdušňovanie vody je nutné počas pridávania lariev do testovacích nádob prerušiť a musí byť pozastavené počas ďalších 24 hodín po pridaní lariev (pozri odseky 24 a 32). Podľa použitej koncepcie testu (pozri odseky 19 a 20) je počet lariev použitých pri každej koncentrácii najmenej 60 na odhad bodu EC a 80 na stanovenie koncentrácie NOEC.

26. Dvadsaťštyri hodín po pridaní lariev sa do nadložného vodného stĺpca pridá testovaná látka a opäť sa začne s jemným prevzdušňovaním. Pod povrch vody sa pomocou pipety aplikujú malé množstvá roztokov testovanej látky. Nadložná voda sa potom opatrne premieša, aby sa nenarušil sediment.

Testovacie koncentrácie

27. Pri určovaní rozsahu koncentrácií pre konečný test môže byť užitočný test na zistenie rozsahu. Na tento účel sa použije súbor koncentrácií testovanej látky s veľkými odstupmi. S cieľom zabezpečiť rovnakú hustotu povrchu na pakomára, ktorá sa použije pri konečnom teste, sú pakomáre vystavené každej koncentrácii testovanej látky na obdobie, ktoré umožňuje odhad vhodných testovacích koncentrácií, pričom nie sú potrebné žiadne replikáty.

28. Testovacie koncentrácie pre konečný test sa vyberú na základe výsledkov testu na zistenie rozsahu. Je potrebné použiť a vybrať najmenej päť koncentrácií, ako sa uvádza v odsekoch 18 – 20.

Kontroly

29. Súčasťou testu sú kontrolné nádoby bez prítomnosti testovanej látky, ktoré však obsahujú sediment, a primeraný počet replikátov (pozri odseky 19 – 20). Ak sa pri aplikácii testovanej látky použije rozpúšťadlo (pozri odsek 16), je potrebné pridať kontrolu rozpúšťadla v sedimente.

▼M4

Testovací systém

30. Použijú sa statické systémy. Vo výnimočných prípadoch sa môžu použiť semistatické alebo prietokové systémy s prerušovaným alebo nepretržitým obmieňaním nadložnej vody, napríklad ak sú špecifikácie kvality vody nevhodné pre testovacie organizmy alebo ak ovplyvňujú chemickú rovnováhu (napr. úrovne rozpusteného kyslíka príliš klesnú, koncentrácia vylučovaných produktov príliš stúpne alebo sa zo sedimentu lúhujú minerály, čo má vplyv na pH a/alebo tvrdosť vody). Zvyčajne však postačujú a uprednostňujú sa iné metódy zlepšenia kvality nadložnej vody, ako napríklad prevzdušňovanie.

Potrava

31. Je nevyhnutné larvy kŕmiť podľa možnosti každý deň alebo najmenej trikrát do týždňa. V prvých desiatich dňoch je pre mladé larvy podľa všetkého vhodné krmivo pre ryby (suspenzia vo vode alebo jemne rozomletá potrava, napr. Tetra-Min alebo Tetra-Phyll, bližšie informácie pozri v dodatku 2) v dennom množstve 0,25 – 0,5 mg (0,35 – 0,5 mg pre druh *C. yoshimatsui*) na jednu larvu. Pre staršie larvy môže byť potrebné o niečo väčšie množstvo potravy: denné množstvo 0,5 – 1 mg na jednu larvu by malo po zvyšok testu postačovať. Ak sa pozoruje rast hubovitých organizmov alebo ak sa v kontrolných nádobách pozoruje mortalita, prídel potravy by sa mal vo všetkých testovacích a kontrolných nádobách znížiť. Ak nie je možné vznik hubovitých organizmov zastaviť, test je nutné opakovať. Pri testovaní silno adsorbujúcich látok (napr. s log K_{ow} > 5) alebo látok, ktoré sa kovalentne viažu na sediment, sa môže do umelo pripraveného sedimentu pred stabilizačným obdobím pridať množstvo potravy potrebné na zabezpečenie prežitia a prirodzeného rastu organizmov. Na tento účel sa namiesto krmiva pre ryby musí použiť rastlinný materiál, napr. sa môže pridať 0,5 % (suchá hmotnosť) jemne rozomletých listov napr. príhľavy dvojdomej (*Urtica dioica*), moruše (*Morus alba*), ďateliny plazivej (*Trifolium repens*), špenátu (*Spinacia oleracea*) alebo iného rastlinného materiálu (*Cerophyl* alebo alfa celulóza).

Podmienky inkubácie

32. Najlepšie po 24 hodinách od pridania lariev sa zabezpečí jemné prevzdušňovanie nadložnej vody v testovacích nádobách a pokračuje v ňom počas celého testu (treba dbať na to, aby koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesla pod 60 % ASV). Prevzdušňovanie sa zabezpečí pomocou sklenenej Pasteurovej pipety upevnenej 2 – 3 cm nad vrstvou sedimentu (t. j. jedna alebo niekoľko bublín za sekundu). Ak sa testujú prchavé chemikálie, možno zvážiť, že systém sediment – voda sa nebude prevzdušňovať.

33. Test sa vykonáva pri konštantnej teplote 20 °C (± 2 °C). V prípade druhu *C. tentans* sa odporúča teplota 23 °C a v prípade *C. yoshimatsui* 25 °C (± 2 °C). Použije sa 16-hodinová svetlá fáza, pričom intenzita svetla by mala byť 500 – 1 000 luxov.

Trvanie expozície

34. Expozícia sa začne pridaním lariev do obohatených a kontrolných nádob. Maximálna dĺžka expozície je 28 dní v prípade druhov *C. riparius* a *C. yoshimatsui* a 65 dní v prípade *C. tentans*. Ak sa pakomáre vykuklia skôr, test sa môže ukončiť najskôr päť dní po vykuklení posledného dospelého jedinca v kontrolnej skupine.

POZOROVANIA

Vykuklenie

35. Určí sa čas vývoja a celkový počet úplne vykuklených samčích a samičích pakomárov. Samčeky sa ľahko identifikujú podľa obrvených tykadiel.

▼M4

36. Testovacie nádoby je potrebné pozorovať najmenej trikrát do týždňa s cieľom vizuálne zhodnotiť každé abnormálne správanie (napr. opúšťanie sedimentu, nezvyčajné plávanie) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Počas obdobia očakávaného vykuklenia je nevyhnutné každý deň spočítať vykuklené pakomáre. Pohlavie a počet úplne vykuklených pakomárov sa zaznamenáva denne. Po identifikácii sa pakomáre vyberú z nádob. Všetky vajíčkové masy nakladené pred ukončením testu sa zaznamenajú a následne odstránia, aby sa predišlo opätovnému zavedeniu lariev do sedimentu. Takisto sa zaznamená počet viditeľných kukiel, ktoré sa nevykuklili. Usmernenie k meraniu vykuklenia je uvedené v dodatku 5.

Rast a prežívanie

37. Ak je potrebné získať údaje o desaťdňovom prežívaní a raste lariev, na začiatku sa pripravia ďalšie testovacie nádoby tak, aby sa mohli následne použiť. Sediment z týchto ďalších nádob sa precedí pomocou cedidla s hrúbkou 250 μm, aby sa zachytili larvy. Kritériami na stanovenie smrti sú nehybnosť alebo chýbajúca reakcia na mechanický podnet. Stratené larvy sa takisto počítajú medzi mŕtve (larvy, ktoré uhynuli na začiatku testu, sa mohli rozložiť pôsobením mikróbov). Určí sa suchá hmotnosť (bez popola) lariev, ktoré prežili v každej testovacej nádobe, a vypočíta sa stredná suchá hmotnosť jedincov na jednu nádobu. Je užitočné určiť, do ktorého instaru patria larvy, ktoré prežili. Na toto meranie sa môže použiť šírka hlavového segmentu každého jedinca.

Analytické merania

Koncentrácia testovanej látky

38. Vzorky nadložnej vody, pórovej vody a sedimentu sa musia analyzovať minimálne na začiatku (najlepšie jednu hodinu po aplikácii testovanej látky) a na konci testu pri najvyššej koncentrácii a pri jednej nižšej koncentrácii. Tieto skúmania koncentrácie testovanej látky poskytujú informácie o správaní/delení testovanej látky v systéme voda – sediment. Odoberanie vzoriek na začiatku testu môže ovplyvniť testovací systém (napr. odstránenie testovaných lariev), preto je potrebné použiť ďalšie testovacie nádoby, aby bolo podľa potreby možné vykonať analytické vyšetrenia na začiatku a počas testu (pozri odsek 39). Merania v sedimente nemusia byť potrebné, ak sa delenie testovanej látky medzi vodu a sediment jednoznačne určilo v štúdii voda/sediment pri porovnateľných podmienkach (napr. pomer sedimentu k vode, druh aplikácie, obsah organického uhlíka v sedimente).

39. Ak sa vykonajú prostredné merania (napr. v deň 7) a ak sú na analýzu potrebné veľké vzorky, ktoré nemožno odobrať z testovacích nádob bez ovplyvnenia testovacieho systému, analytické vyšetrenia je potrebné vykonať na vzorkách z ďalších testovacích nádob, s ktorými sa zaobchádzalo rovnakým spôsobom (vrátane prítomnosti testovacích organizmov), ale ktoré sa nepoužijú na biologické pozorovania.

40. Na izolovanie intersticiálnej vody je odporúčaným postupom odstredenie napr. pri 10 000 g a 4 °C počas 30 minút. Ak sa však preukáže, že testovaná látka sa na filtroch neadsorbuje, môže byť prijateľná aj filtrácia. V niektorých prípadoch nemusí byť možné analyzovať koncentrácie v pórovej vode, lebo vzorka je príliš malá.

▼M4

Fyzikálno-chemické parametre

41. Je potrebné vhodným spôsobom odmerať pH, rozpustený kyslík v testovacej vode a teplotu v testovacích nádobách (pozri odsek 10). Tvrdosť a amoniak sa merajú v kontrolných nádobách a v jednej testovacej nádobe pri najvyššej koncentrácii na začiatku a na konci testu.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

42. Účelom tohto testu je určiť účinok testovanej látky na vývojový pomer a celkový počet úplne vykuklených samčích a samičích pakomárov, alebo v prípade desaťdňového testu účinky na prežívanie a hmotnosť lariev. Ak nič nepoukazuje na štatisticky rozdielnu vnímavosť medzi pohlaviami, výsledky pre samčeky a samičky možno na účely štatistických analýz zhrnúť spoločne. Rozdiely vnímavosti medzi pohlaviami sa môžu štatisticky posúdiť, napr. tabuľkovým testom $\chi^2 - r \times 2$. Prežívanie lariev a stredná suchá hmotnosť jedincov na jednu nádobu sa podľa potreby musí určiť po desiatich dňoch.

43. Účinné koncentrácie vyjadrené ako koncentrácie v nadložnej vode sa podľa možnosti vypočítajú na základe nameraných koncentrácií na začiatku testu (pozri odsek 38).

44. Na vyčíslenie odhadu bodu EC_{50} alebo akejkoľvek inej hodnoty EC_x sa ako pravé replikáty môže použiť štatistika na jednu nádobu. Pri výpočte intervalu spoľahlivosti pre každú hodnotu EC_x je potrebné zohľadniť variabilitu medzi nádobami alebo je nutné preukázať, že táto variabilita je taká malá, že je možné ju ignorovať. Ak sa model upraví metódou najmenších štvorcov, v štatistike na jednu nádobu je potrebné aplikovať transformáciu, aby sa zlepšila homogénnosť rozptylu. Hodnoty EC_x by sa však mali vypočítať po tom, ako sa reakcia transformuje naspäť na pôvodnú hodnotu.

45. Ak je cieľom štatistickej analýzy určenie koncentrácie NOEC/LOEC prostredníctvom testovania hypotézy, je potrebné zohľadniť variabilitu medzi nádobami, napr. pomocou hierarchickej analýzy ANOVA. Alternatívne môžu byť vhodné podrobnejšie testy (21) v prípadoch, keď dochádza k nedodržaniu zvyčajných predpokladov analýzy ANOVA.

Pomer vykuklenia

46. Pomery vykuklenia sú kvantové údaje a môžu sa analyzovať pomocou Cochranovho-Armitageho testu aplikovaného zostupne v prípadoch, keď sa očakáva monotónna reakcia na dávku a tieto údaje zodpovedajú tomuto očakávaniu. Ak tomu tak nie je, možno použiť Fisherov exaktný test alebo Mantzelov-Haentzalov test s Bonferroniho-Holmovou úpravou hodnôt p. Ak sa medzi replikátmi pri rovnakej koncentrácii preukáže väčšia variabilita, než akú by indikovala binomická distribúcia (často sa uvádza ako „extra-binomická“ variácia), potom by sa mal použiť podrobný Cochranov-Armitageho test alebo Fisherov exaktný test, ako sa navrhuje v bode (21).

47. Určí sa súčet pakomárov vykuklených na jednu nádobu, ne, a vydelí sa počtom zavedených lariev, na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼**M4**

kde:

ER = pomer vykuklenia,

n_e = počet pakomárov vykuklených na nádobu,

n_a = počet zavedených lariev na nádobu.

48. Najvhodnejšou alternatívou pri veľkých vzorkách v prípadoch extra binomickej variácie je brať pomer vykuklenia (ER) ako nepretržitú reakciu a použiť postupy, ako je napríklad Williamsov test, ak sa očakáva monotónna reakcia na dávku, ktorá je konzistentná s týmito údajmi o ER. Ak reakcia nie je monotónna, je vhodný Dunnettov test. Za veľkú vzorku sa pokladá vzorka, v ktorej je počet vykuklených aj počet nevykuklených jedincov v každom replikáte (nádobe) vyšší ako päť.

49. Pri aplikovaní metód ANOVA je potrebné najskôr transformovať hodnoty ER pomocou arkussínusovej transformácie druhej odmocniny alebo Freemanovej-Tukeyho transformácie s cieľom získať približnú normálnu distribúciu a vyrovnať rozptyly. Cochranov-Armitageho test, Fisherov exaktný (Bonferroniho) test alebo Mantelov-Haenszelov test možno aplikovať, ak sa použijú absolútne frekvencie. Arkussínusová transformácia druhej odmocniny sa aplikuje pomocou prevrátenej hodnoty sínusu ($\sin^{-1}$) druhej odmocniny ER.

50. Pri pomeroch vykuklenia sa hodnoty EC_x vypočítajú pomocou regresnej analýzy (alebo napr. pomocou modelov probit (22), logit, Weibull, vhodného komerčného softvéru atď.). Ak je regresná analýza neúspešná (napr. ak sú k dispozícii menej ako dve čiastkové reakcie), použijú sa iné neparametrické metódy, ako je metóda pohyblivého priemeru alebo jednoduchá interpolácia.

Vývojový pomer

51. Stredný vývojový čas predstavuje stredné časové rozpätie medzi zavedením lariev (deň 0 testu) a vykuklením pokusnej kohorty pakomárov. (Pri výpočte reálneho vývojového času sa zohľadní vek lariev v čase zavedenia). Vývojový pomer je prevrátená hodnota vývojového času (jednotka: 1/deň) a predstavuje časť vývinu lariev, ktorá prebieha za deň. Pri hodnotení týchto štúdií toxicity v sedimente sa uprednostňuje vývojový pomer, lebo jeho rozptyl je nižší a v porovnaní s vývojovým časom je homogénnejší a bližší normálnej distribúcii. Výkonné parametrické testovacie postupy teda možno lepšie použiť s vývojovým pomerom ako s vývojovým časom. Pre vývojový pomer ako nepretržitú reakciu možno hodnoty EC_x odhadnúť pomocou regresnej analýzy [napr. (23) (24)].

52. Pri nasledujúcich štatistických testoch sa predpokladá, že počet pakomárov pozorovaných v kontrolnom dni × sa vykuklil v strednom časovom intervale medzi dňom × a dňom x - l (l = dĺžka kontrolného intervalu, zvyčajne jeden deň). Stredný vývojový pomer na nádobu *x*) sa vypočíta podľa tejto rovnice:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

kde:

$\bar{x}$: stredný vývojový pomer na nádobu,

i : index kontrolného intervalu,

m : maximálny počet kontrolných intervalov,

▼M4

f_i : počet pakomárov vykuklených v kontrolnom intervale i,

n_e : celkový počet pakomárov vykuklených na konci pokusu (= $\sum f_i$),

x_i : vývojový pomer pakomárov vykuklených v intervale i;

$$x_i = 1 / \left(day_i - \frac{l_i}{2} \right)$$

kde:

$deň_i$: kontrolný deň (dni od aplikácie),

l_i: dĺžka kontrolného intervalu i (dni, zvyčajne jeden deň).

Správa o teste

53. Správa o teste musí obsahovať aspoň tieto informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter a, ak je to relevantné, fyzikálno-chemické vlastnosti (rozpustnosť vo vode, tlak pary, rozdeľovací koeficient v pôde (alebo v sedimente, ak je k dispozícii), stabilita vo vode atď.),

— chemické identifikačné údaje (bežný názov, chemický názov, štruktúrálny vzorec, číslo CAS atď.) vrátane čistoty a analytickej metódy kvantifikácie testovanej látky.

Testovacie druhy:

— použité testovacie zvieratá: druh, vedecký názov, zdroj organizmov a podmienky chovu,

— informácie o manipulácii s vajíčkovými masami a larvami,

— vek testovacích zvierat pri umiestnení do testovacích nádob.

Podmienky testovania:

— použitý sediment, t. j. prírodný alebo umelo pripravený sediment,

— v prípade prírodného sedimentu poloha a opis miesta odobratia vzoriek sedimentu vrátane histórie kontaminácie, ak je to možné, charakteristiky: pH, obsah organického uhlíka, pomer C/N a granulometria (podľa potreby),

— príprava umelo pripraveného sedimentu: zložky a charakteristiky (obsah organického uhlíka, pH, vlhkosť atď. na začiatku testu),

— príprava testovacej vody (ak sa použije rekonštituovaná voda) a charakteristiky (koncentrácia kyslíka, pH, vodivosť, tvrdosť atď. na začiatku testu),

— výška sedimentu a nadložnej vody,

— objem nadložnej a pórovej vody, hmotnosť mokrého sedimentu s pórovou vodou a bez nej,

— testovacie nádoby (materiál a veľkosť),

— metóda prípravy zásobných roztokov a testovacích koncentrácií,

▼M4

— aplikácia testovanej látky: použité testovacie koncentrácie, počet replikátov a prípadné použitie rozpúšťadiel,

— inkubačné podmienky: teplota, svetelný cyklus a intenzita, prevdzušňovanie (frekvencia a intenzita),

— podrobné informácie o kŕmení vrátane druhu potravy, prípravy, množstva a kŕmneho režimu.

Výsledky:

— nominálne testovacie koncentrácie, namerané testovacie koncentrácie a výsledky všetkých analýz na stanovenie koncentrácie testovanej látky v testovacej nádobe,

— kvalita vody v testovacích nádobách, t. j. pH, teplota, rozpustený kyslík, tvrdosť a amoniak,

— kompenzácia prípadnej vyparenej testovacej vody,

— počet vykuklených samčích a samičích pakomárov na nádobu na deň,

— počet lariev na nádobu, ktoré sa nevykuklili,

— stredná suchá hmotnosť jednotlivých lariev na nádobu a na instar podľa potreby,

— percentuálne vykuklenie na replikát a testovaciu koncentráciu (samčie a samičie pakomáre spolu),

— stredný vývojový pomer úplne vykuklených pakomárov na replikát a miera ošetrenia (samčie a samičie pakomáre spolu),

— odhady toxických parametrov, napr. EC_x (a súvisiace intervaly spoľahlivosti), NOEC a/alebo LOEC a štatistické metódy použité na ich stanovenie,

— rozbor výsledkov vrátane každého vplyvu na výsledok testu vyplývajúceho z odchýlok od tejto testovacej metódy.

LITERATÚRA

1. BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Upravili M. Streloke a H. Köpp. Berlín 1995.

2. Fleming, R. a kol. (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Záverečná správa pre Európsku komisiu. Správa č.: EK, 3738. August 1994. WRc, UK.

3. SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Zo seminára WOSTA, ktorý sa uskutočnil v Holandsku.

4. ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, s. 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. Druhé vydanie. EPA 600/R-99/064. Marec 2000. Revízia prvého vydania z júna 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, K. E., McLeay, D. J., Kirby, R. S. (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, Kanada.

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. Kapitola C.8 tejto prílohy, Toxicita pre dážďovky.

15. Suedel, B. C., a Rodgers, J. H. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163 – 1175.

16. Naylor, C., a Rodrigues, C. (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291 – 3303.

17. Dunnett, C. W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096 – 1121.

18. Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482 – 491.

19. 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.

20. Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510 – 531.

21. Rao, J. N. K., a Scott, A. J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577 – 585.

22. Christensen, E. R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213 – 221.

23. Bruce a 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**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Na účely tejto metódy sa používajú tieto vymedzenia pojmov:

Umelo pripravený sediment alebo rekonštituovaný, umelý alebo syntetický sediment je zmes materiálov použitých na napodobnenie fyzických zložiek prírodného sedimentu.

Nadložná voda je voda umiestnená v testovacej nádobe nad sedimentom.

Intersticiálna voda alebo pórová voda je voda nachádzajúca sa v priestore medzi časticami sedimentu a pôdy.

Obohatená voda je voda, do ktorej bola pridaná testovaná látka.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M4

Dodatok 2

Odporúčania ku kultúre *Chironomus riparius*

1. Larvy rodu *Chironomus* sa môžu chovať v kryštalizačných miskách alebo vo väčších nádobách. Na dno nádoby sa nanesie tenká vrstva jemného kremenného piesku vo výške 5 – 10 mm. Je preukázané, že vhodným substrátom je aj diatomit (napr. Merck, článok 8117) (postačuje tenšia vrstva do výšky len niekoľkých milimetrov). Potom sa pridá vhodná voda do výšky niekoľkých centimetrov. Hladiny vody by sa mali podľa potreby dopĺňať, aby sa kompenzovala strata vyparením a aby sa predišlo vysychaniu. Vodu je možné v prípade potreby vymeniť. Je potrebné zabezpečiť jemné prevzdušňovanie. Misky na chov lariev by mali byť umiestnené vo vhodnej klietke, ktorá zabráni úniku vykuklených dospelých jedincov. Klietka by mala byť dostatočne veľká, aby umožňovala rojenie vykuklených dospelých jedincov, v opačnom prípade by nemuselo dôjsť ku kopulácii (minimálna veľkosť je asi 30 × 30 × 30 cm).

2. Klietky je potrebné udržiavať pri izbovej teplote alebo v miestnosti so stálym prostredím pri teplote 20 ± 2 °C so svetlou fázou v trvaní 16 hodín (intenzita asi 1 000 luxov) a fázou tmy v trvaní osem hodín. Je preukázané, že vlhkosť vzduchu nižšia ako 60 % RH môže brániť reprodukcii.

Riediaca voda

3. Možno použiť akúkoľvek vhodnú prírodnú alebo syntetickú vodu. Bežne sa používa studňová voda, odchlórovaná voda z vodovodu a umelé médiá (napr. Elendtovo médium „M4“ alebo „M7“, pozri ďalej). Pred použitím je potrebné vodu prevzdušniť. V prípade potreby možno kultivačnú vodu obnoviť opatrným odliatím alebo odčerpaním použitej vody z kultivačných nádob bez toho, aby sa poškodili trubice lariev.

Kŕmenie lariev

4. Larvy rodu *Chironomus* sa kŕmia vločkovým krmivom pre ryby [Tetra Min®, Tetra Phyll® alebo inou podobnou značkou patentovaného krmiva pre ryby] približným množstvom 250 mg na nádobu na deň. Krmivo sa môže podávať ako suchý rozomletý prášok alebo ako suspenzia vo vode: 1,0 g vločkového krmiva sa pridá do 20 ml riediacej vody a premieša sa, aby sa získala homogénna zmes. Tento prípravok sa môže podávať v množstve približne 5ml na nádobu na deň (pred použitím pretrepať). Staršie larvy môžu dostávať viac.

5. Kŕmenie sa upraví podľa kvality vody. Ak sa kultivačné médium zakalí, kŕmenie je potrebné obmedziť. Prídavky do krmiva sa musia starostlivo monitorovať. Nedostatok potravy spôsobí, že larvy sa budú presúvať k vodnému stĺpcu, a prebytok potravy spôsobí zvýšenie činnosti mikróbov a zníženie koncentrácií kyslíka. V obidvoch prípadoch môže dôjsť k zníženiu rastových pomerov.

6. Pri založení nových kultivačných nádob sa môžu pridať aj bunky niektorých zelených rias (napr. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

Kŕmenie vykuklených dospelých jedincov

7. Z niektorých pokusov vyplýva, že ako potrava pre vykuklené dospelé jedince môže slúžiť vatový tampón napustený nasýteným sacharózovým roztokom.

▼M4

Vykuklenie

8. Pri teplote 20 ± 2 °C sa dospelé jedince začnú kukliť z nádoby na chov lariev po približne 13 – 15 dňoch. Samčeky sa ľahko rozlíšia podľa obrvených tykadiel.

Vajíčkové masy

9. Keď sú v chovnej klietke prítomné dospelé jedince, vo všetkých nádobách na chov lariev je potrebné trikrát do týždňa kontrolovať kladenie želatínových vajíčkových más. Ak sú vajíčkové masy prítomné, opatrne sa odoberú. Mali by sa preniesť na malú misku so vzorkou kultivačnej vody. Vajíčkové masy sa použijú na založenie nových kultivačných nádob (napr. dve až štyri vajíčkové masy na nádobu) alebo sa použijú v testoch toxicity.

10. Larvy prvého instaru by sa mali vyliahnuť po dvoch až troch dňoch.

Založenie nových kultivačných nádob

11. Po vytvorení kultúr by malo byť možné založiť novú nádobu na kultiváciu lariev každý týždeň alebo menej často v závislosti od testovacích požiadaviek, pričom staršie nádoby sa po vykuklení dospelých pakomárov odstránia. Týmto spôsobom sa pri minimálnom riadení zabezpečí pravidelné dopĺňanie dospelých jedincov.

Príprava testovacích roztokov „M4“ a „M7“

12. Elendt (1990) opísal médium „M4“. Médium „M7“ sa pripravuje ako médium „M4“ s výnimkou látok označených v tabuľke 1, pre ktoré sú koncentrácie v médiu „M7“ štyrikrát nižšie ako v médiu „M4“. Publikácia o médiu „M7“ je v štádiu prípravy (Elendt, osobná komunikácia). Testovací roztok by sa nemal pripraviť podľa Elendta a Biasa (1990), lebo koncentrácie $NaSiO_3.5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 a K_2HPO_4 uvedené pre prípravu zásobných roztokov nie sú vhodné.

Príprava média „M7“

13. Každý zásobný roztok (I) sa pripraví jednotlivo a kombinovaný zásobný roztok (II) sa pripraví z týchto zásobných roztokov (I) (pozri tabuľku 1). Na prípravu média „M7“ sa 50 ml z kombinovaného zásobného roztoku (II) a množstvá každého makronutričného zásobného roztoku uvedené v tabuľke 2 doplnia do 1 l deionizovanej vody. Vitamínový zásobný roztok sa pripraví pridaním troch vitamínov do deionizovanej vody, ako je uvedené v tabuľke 3, a krátko pred použitím sa do konečného média „M7“ pridá 0,1 ml kombinovaného vitamínového zásobného roztoku. (Vitamínový zásobný roztok sa skladuje zmrazený v malých alikvotných častiach). Médium sa prevzdušňuje a stabilizuje.

Tabuľka 1

Zásobné roztoky stopových prvkov pre médiá M4 a M7

Zásobné roztoky (I)	Množstvo (mg) doplnené do jedného litra deionizovanej vody	Na prípravu kombinovaného zásobného roztoku (II) sa zmiešajú tieto množstvá (ml) zásobných roztokov (I) a doplnia sa do jedného litra deionizovanej vody		Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch (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**

Zásobné roztoky (I)	Množstvo (mg) doplnené do jedného litra deionizovanej vody	Na prípravu kombinovaného zásobného roztoku (II) sa zmiešajú tieto množstvá (ml) zásobných roztokov (I) a doplnia sa do jedného litra deionizovanej vody		Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Tieto látky sa líšia v M4 a M7, ako je uvedené vyššie.
(2) Tieto roztoky sa pripravia jednotlivo, potom sa zlejú dokopy a okamžite sa autoklávujú.

Tabuľka 2

Makronutričné zásobné roztoky pre médiá M4 a M7

	Množstvo doplnené do jedného litra deionizovanej vody (mg)	Množstvo pridaných makronutričných zásobných roztokov pri príprave médií M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch M4 a 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**

Tabuľka 3

Vitamínový zásobný roztok pre médiá M4 a M7

Všetky tri vitamínové roztoky sa skombinujú, aby sa vytvoril jeden vitamínový zásobný roztok.

	Množstvo doplnené do jedného litra deionizovanej vody (mg)	Množstvo pridaného vitamínového zásobného roztoku pri príprave médií M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch M4 a M7 (mg/l)
Tiamín hydrochlorid	750	0,1	0,075
Kyanokobalamín (B12)	10	0,1	0,0010
Biotín	7,5	0,1	0,00075

LITERATÚRA

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Upravili M. Streloke a H.Köpp. Berlín 1995.

Elendt, B. P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25 – 33.

Elendt, B. P., a 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

Dodatok 3

PRÍPRAVA UMELO PRIPRAVENÉHO SEDIMENTU

Zloženie sedimentu

Zloženie umelo pripraveného sedimentu by malo byť takéto:

Zložka	Charakteristika	% suchej hmotnosti sedimentu
Rašelina	Rašelinníková rašelina, pH čo najbližšie k 5,5 – 6,0, bez viditeľných zvyškov rastlín, jemne rozomletá (veľkosť častíc ≤ 1 mm) a usušená vzduchom	4 – 5
Kremenný piesok	Veľkosť zrniek: > 50 % častíc by malo mať veľkosť v rozsahu 50 – 200 μm	75 – 76
Kaolín	Obsah kaolinitu ≥ 30 %	20
Organický uhlík	Upravený pridaním rašeliny a piesku	2 (± 0,5)
Uhličitan vápenatý	$CaCO_3$, rozomletý na prach, chemicky čistý	0,05 – 0,1
Voda	Vodivosť ≤ 10 μS/cm	30 – 50

Príprava

Rašelina sa usuší vzduchom a rozomelie na jemný prášok. V deionizovanej vode sa pomocou vysokovýkonného homogenizačného prístroja pripraví suspenzia požadovaného množstva rašelinového prášku. Hodnota pH tejto suspenzie sa upraví na 5,5 ± 0,5 pomocou $CaCO_3$. Suspenzia sa aspoň na dva dni uvedie do podmienok jemným premiešavaním pri teplote 20 ± 2 °C, aby sa stabilizovala hodnota pH a vytvorila stabilná mikrobiálna zložka. Opäť sa zmeria pH, ktoré by malo byť na úrovni 6,0 ± 0,5. Rašelinová suspenzia sa následne zmieša s ostatnými zložkami (piesok a kaolín) a s deionizovanou vodou, aby sa získal homogénny sediment s obsahom vody v rozsahu 30 – 50 percent suchej hmotnosti sedimentu. Znova sa zmeria hodnota pH konečnej zmesi a podľa potreby sa pomocou $CaCO_3$ upraví na 6,5 – 7,5. Odoberú sa vzorky sedimentu, aby sa určila suchá hmotnosť a obsah organického uhlíka. Následne sa odporúča, aby sa pred použitím v teste toxicity pri pakomároch umelo pripravený sediment uviedol na sedem dní do rovnakých podmienok, aké budú prevládať v nasledujúcom teste.

Skladovanie

Suché zložky na prípravu umelého sedimentu sa môžu skladovať na suchom a chladnom mieste pri izbovej teplote. Umelo pripravený (mokrý) sediment by sa pred použitím v teste nemal skladovať. Mal by sa použiť hneď po sedemdňovom období uvádzania do podmienok, ktorým sa končí jeho príprava.

LITERATÚRA:

Kapitola C.8 tejto prílohy. Toxicita pre dážďovky.

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**

Dodatok 4

Chemické charakteristiky prijateľnej riediacej vody

Látka	Koncentrácie
Pevné častice	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Tvrdosť ako $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Zostatkový chlór	< 10 µg/l
Celkové organofosfátové pesticídy	< 50 ng/l
Celkové organochlórované pesticídy plus polychlórované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlór	< 25 ng/l

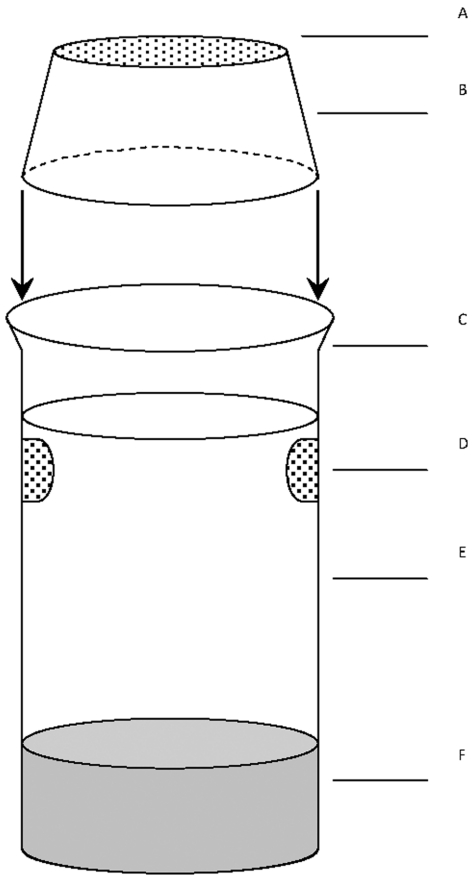
(*) Treba však poznamenať, že ak existuje podozrenie na interakciu medzi iónmi tvrdosti a testovanou látkou, mala by sa použiť voda s nižšou tvrdosťou (a v takom prípade sa teda nesmie použiť Elendtovo médium M4).

▼**M4**

Dodatok 5

Usmernenie k monitorovaniu vykuklenia lariev pakomárov

Na testovacie kadičky sa umiestnia pasce na vykuklené jedince. Tieto pasce sú potrebné odo dňa 20 do skončenia testu. Ďalej je znázornený príklad použitej pasce.



A: nylonová sieťka

B: prevrátené umelohmotné misky

C: expozičná kadička bez okraja

D: sieťované otvory na výmenu vody

E: voda

F: sediment

▼M4

C.29. ĽAHKÁ BIODEGRADOVATEĽNOSŤ – CO_2 V HERMETICKY UZAVRETÝCH NÁDOBÁCH (TEST V UZAVRETOM PRIESTORE NAD KVAPALINOU)

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov (TG) 310 (2003). Táto testovacia metóda je skríningovou metódou na hodnotenie ľahkej biodegradovateľnosti chemikálií a poskytuje podobné informácie ako šesť testovacích metód opísaných v kapitole C.4 tejto prílohy A až F. Chemikáliu, pri ktorej sa v tejto testovacej metóde preukážu pozitívne výsledky, možno preto považovať za ľahko biodegradovateľnú, a teda za rýchlo degradovateľnú v životnom prostredí.

2. Zvyčajne bola prvou voľbou na testovanie slabo rozpustných chemikálií a chemikálií, ktoré silne adsorbujú, osvedčená metóda (1) oxidu uhličitého (CO_2) založená na Sturmovom pôvodnom teste (2) na hodnotenie biodegradovateľnosti organických chemikálií meraním oxidu uhličitého vytváraného mikrobiálnym pôsobením. Vyberá sa aj v prípade rozpustných (ale nie prchavých) chemikálií, lebo uvoľňovanie oxidu uhličitého mnohí považujú za jediný jednoznačný dôkaz mikrobiálnej činnosti. Rozpustený organický uhlík možno odstrániť fyzikálno-chemickými procesmi (adsorpciou, vyparením, zrážaním, hydrolýzou), ako aj mikrobiálnym pôsobením, pričom mnohé nebiologické reakcie spotrebúvajú kyslík. V zriedkavých prípadoch sa CO_2 z organických chemikálií tvorí abioticky. V pôvodnom a modifikovanom Sturmovom teste (1) (2) sa CO_2 odstráni z tekutej fázy do absorbujúcich nádob čerením (t. j. bublajúcim vzduchom aplikovaným s cieľom odstrániť CO_2 cez tekuté médium), zatiaľ čo v Larsonovej verzii (3) (4) sa CO_2 prevedie z reakčnej nádoby do absorbérov púšťaním vzduchu bez obsahu CO_2 cez uzavretý priestor nad kvapalinou a ďalej nepretržitým pretrepávaním testovacej nádoby. Reakčná nádoba sa pretrepáva iba v Larsonovej modifikácii. Premiešavanie je v ISO 9439 (5) a v pôvodnej americkej verzii (6) špecifikované iba pre nerozpustné látky, pričom obe normy špecifikujú skôr čerenie namiesto výmeny uzavretého priestoru nad kvapalinou. V ďalšej oficiálnej metóde USA EPA (7) založenej na Gledhillovej metóde (8) sa pretrepávaná reakčná nádoba uzavrie pred ovzduším a vyprodukované CO_2 sa hromadí vo vnútornom alkalickom zachytávači priamo z plynnej fázy podobne ako v prípade klasických Warburgových/Barcroftových respirometrických baniek.

3. Ukázalo sa však, že počas aplikácie štandardného modifikovaného Sturmovho testu na viaceré chemikálie sa v médiu hromadí anorganický uhlík (IC) (9). Počas degradácie 20 mg C/l anilínu bola zistená koncentrácia IC až 8 mg/l. Hromadenie CO_2 v alkalických zachytávačoch preto nezodpovedalo reálnemu množstvu mikrobiologicky vyprodukovaného CO_2 v medzičasoch počas degradácie. Špecifikácia, podľa ktorej na to, aby sa testovaná chemikália klasifikovala ako ľahko biodegradovaná, sa musí počas „desaťdňového okna“ (desať dní nasledujúcich ihneď po dosiahnutí 10 % biodegradácie) nahromadiť > 60 % teoretickej maximálnej produkcie CO_2 ($ThCO_2$), nebude splnená v prípade niektorých chemikálií, ktoré by takto boli klasifikované po použití eliminácie rozpusteného organického uhlíka (DOC).

4. Ak je percentuálna degradácia nižšia, ako sa očakáva, je možné, že IC sa akumuloval v testovacom roztoku. Degradovateľnosť sa potom môže hodnotiť pomocou iných testov ľahkej biodegradovateľnosti.

▼M4

5. Ďalšie nedostatky Sturmovej metodiky (náročnosť vykonania, náročnosť na čas, náchylnosť k chybám pri pokusoch a nemožnosť použitia v prípade prchavých chemikálií) dali podnet k skúmaniu metódy uzavretej nádoby, ktorá by bola iná ako Gledhillova a ktorá by nahradila prúdenie plynu (10) (11). Boatman a kolektív (12) vyhodnotili predchádzajúce metódy a zaviedli systém uzavretého priestoru nad kvapalinou, v ktorom sa CO_2 na konci inkubácie uvoľňoval do priestoru nad kvapalinou prostredníctvom okysľovania média. CO_2 sa meral plynovou chromatografiou (GC)/analýzou IC vo vzorkách automaticky odoberaných z priestoru nad kvapalinou, ale nezohľadňoval sa rozpustený anorganický uhlík (DIC) v tekutej fáze. Takisto použité nádoby boli veľmi malé (20 ml) a obsahovali iba 10 ml média, čo spôsobovalo problémy napr. pri pridávaní nevyhnutne veľmi malých množstiev nerozpustných testovaných chemikálií a/alebo problém s mikroorganizmami schopnými degradovať testovanú chemikáliu, ktoré mohli byť v inokulovanom médiu prítomné v nedostatočnom množstve alebo vôbec.

6. Tieto problémy prekonali nezávislé štúdie Struijsa a Stoltenkampa (13) a Bircha a Fletchera (14), pričom druhých menovaných inšpirovali ich skúsenosti so zariadením používaným v teste anaeróbnej biodegradácie (15). V prvej metóde (13) sa CO_2 meria v priestore nad kvapalinou po acidifikácii a vyrovnaní, zatiaľ čo v druhej metóde (14) sa meria DIC v plynnej aj tekutej fáze bez ošetrenia. Vyše 90 % vytvoreného IC sa vyskytovalo v tekutej fáze. Obidve metódy majú oproti Sturmovmu testu výhody v tom, že testovací systém je kompaktnejší a ovládateľnejší, môžu sa testovať prchavé chemikálie a predišlo sa možnosti oneskorenia v meraní vyprodukovaného CO_2.

7. Tieto dva prístupy boli skombinované do normy ISO o CO_2 v uzavretom priestore nad kvapalinou (16), ktorá bola podrobená kruhovým testom (17), a práve táto norma predstavuje základ uvedenej testovacej metódy. Tieto dva prístupy sa podobne využili v metóde USA EPA (18). Odporúčajú sa dve metódy merania CO_2, konkrétne CO_2 v uzavretom priestore nad kvapalinou po acidifikácii (13) a IC v tekutej fáze po pridaní prebytočných alkálií. Druhú uvedenú metódu predstavil Peterson počas kruhového testu CONCAWE (19) tejto metódy uzavretého priestoru nad kvapalinou, ktorá bola modifikovaná na meranie inherentnej biodegradovateľnosti. Zmeny vykonané pri revízii metód z roku 1992 (20) v kapitole C.4 tejto prílohy týkajúce sa ľahkej biodegradovateľnosti boli začlenené do tejto testovacej metódy tak, aby podmienky (médium, trvanie atď.) boli inak rovnaké ako podmienky v revidovanom Sturmovom teste (20). Birch a Fletcher (14) preukázali, že pri tomto teste uzavretého priestoru nad kvapalinou sa dosiahli veľmi podobné výsledky, aké sa s rovnakými chemikáliami dosiahli v kruhovom teste OECD (21) revidovaných testovacích metód.

PRINCÍP TESTU

8. Testovaná chemikália, zvyčajne v koncentrácii 20 mg C/l, sa ako jediný zdroj uhlíka a energie inkubuje v tlmivom médiu s obsahom minerálnych solí, ktoré bolo inokulované zmiešanou populáciou mikroorganizmov. Test prebieha v hermeticky uzavretých fľašiach s priestorom nad kvapalinou obsahujúcim vzduch, ktorý predstavuje rezervoár kyslíka pre aeróbnu biodegradáciu. Uvoľňovanie CO_2, ktoré je dôsledkom úplnej aeróbnej biodegradácie testovanej chemikálie, sa stanoví meraním množstva IC vyprodukovaného v testovacích fľašiach, ktoré presahuje množstvo IC vyprodukované v slepých kontrolných nádobách obsahujúcich iba inokulované médium. Rozsah biodegradácie je vyjadrený ako percento teoretickej maximálnej produkcie IC (ThIC) založené na množstve testovanej chemikálie (ako organického uhlíka) pridanej na začiatku testu.

9. Takisto možno odmerať aj elimináciu DOC a/alebo rozsah primárnej biodegradácie testovanej chemikálie (20).

▼M4

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

10. Je potrebné poznať obsah organického uhlíka (hmotnostné percento) v testovanej chemikálii buď z jej chemickej štruktúry, alebo na základe merania, aby bolo možné vypočítať percentuálnu degradáciu. V prípade prchavých testovaných chemikálií je na stanovenie vhodného pomeru priestoru nad kvapalinou k objemu kvapaliny užitočná nameraná alebo vypočítaná Henryho konštanta. Pri výbere vhodnej testovacej koncentrácie a pri interpretácii výsledkov poukazujúcich na slabú biodegradovateľnosť sú užitočné informácie o toxicite testovanej chemikálie na mikroorganizmy: pokiaľ nie je známe, že testovaná chemikália nemá na mikrobiálnu činnosť inhibičné účinky, odporúča sa zahrnúť kontrolu inhibície (pozri odsek 24).

POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

11. Test možno použiť na testované chemikálie rozpustné vo vode a na nerozpustné testované chemikálie, je však potrebné zabezpečiť dobrú disperziu testovanej chemikálie. Pri použití odporúčaného pomeru priestoru nad kvapalinou k objemu kvapaliny 1: 2 možno testovať prchavé chemikálie s Henryho konštantou do 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$, lebo podiel testovanej chemikálie v uzavretom priestore nad kvapalinou nepresiahne 1 % (13). Pri testovaní prchavejších chemikálií možno použiť menší objem priestoru nad kvapalinou, ale ich biodostupnosť môže byť obmedzujúca, najmä ak sú slabo rozpustné vo vode. Používatelia však musia zabezpečiť, aby pomer priestoru nad kvapalinou k objemu kvapaliny a koncentrácia testovanej chemikálie boli také, aby bol k dispozícii dostatok kyslíka, ktorý umožňuje úplnú aeróbnu biodegradáciu (napr. sa treba vyhnúť používaniu vysokej koncentrácie substrátu a malého objemu priestoru nad kvapalinou). Usmernenia k tejto téme sú uvedené v bodoch (13) (23).

REFERENČNÉ CHEMIKÁLIE

12. Na kontrolu postupu testovania sa súbežne testuje referenčná chemikália so známou biodegradovateľnosťou. Na tento účel možno pri testovaní chemikálií rozpustných vo vode použiť anilín, benzoan sodný alebo etylénglykol a pri testovaní slabo rozpustných chemikálií 1-oktanol (13). Biodegradácia týchto chemikálií musí v priebehu 14 dní dosiahnuť úroveň > 60 % ThIC.

REPRODUKOVATEĽNOSŤ

13. V ISO kruhovom teste metódy (17) sa pri použití odporúčaných podmienok vrátane 20 mg C testovanej chemikálie/l získali tieto výsledky.

Testovaná chemikália	Stredná percentuálna biodegradácia (28 d)	Variačný koeficient (%)	Počet laboratórií
Anilín	90	16	17
1-oktanol	85	12	14

Variabilita v rámci testu (replikovateľnosť) pri použití anilínu bola takmer vo všetkých uskutočnených testoch v prípade variačných koeficientov nepresahujúcich 5 % nízka. V dvoch prípadoch, v ktorých bola replikovateľnosť horšia, bola väčšia variabilita pravdepodobne spôsobená vysokou produkciou IC v slepých kontrolných nádobách. Replikovateľnosť bola horšia v prípade 1-oktanolu, ale stále bola v 79 % uskutočnených testov pod úrovňou 10 %. Táto väčšia variabilita v rámci testu mohla byť spôsobená chybami v dávkovaní, lebo do hermeticky uzavretých testovacích fliaš sa musel vstreknúť malý objem (3 – 4 μl) 1-oktanolu. Pri použití nižších koncentrácií testovanej chemikálie by výsledné variačné koeficienty boli vyššie, a to najmä pri koncentráciách nižších ako 10 mg C/l. Čiastočne možno tento problém vyriešiť znížením koncentrácie celkového anorganického uhlíka (TIC) v inokule.

▼M4

14. Kruhový test EÚ (24) piatich povrchovo aktívnych činidiel pridávaných v koncentrácii 10 mg C/l priniesol tieto výsledky:

Testovaná chemikália	Stredná percentuálna biodegradácia (28 d)	Variačný koeficient (%)	Počet laboratórií
Tetrapropylén Benzénsulfonát	17	45	10
Di-izo-oktylsulfo-sukcinát (aniónový)	72	22	9
Hexadecyltrimetyl- (*) amónium chlorid (katiónový)	75	13	10
Izo-nonylfenol-(etoxylát)$_9$ (neiónový)	41	32	10
Koko-amid-propyl dimetylhydroxy sulfobetaín (amfotérny)	60	23	11

(*) SiO_2 bol pridaný s cieľom neutralizovať toxicitu.

Z výsledkov vyplýva, že vo všeobecnosti bola variabilita vyššia v prípade horšie degradovaných povrchovo aktívnych činidiel. Variabilita v rámci testu bola nižšia ako 15 % vo vyše 90 % prípadov, pričom najvyššia úroveň dosiahla 30 – 40 %.

Poznámka: Väčšina povrchovo aktívnych činidiel nie sú jednomolekulové substancie, ale zmesi izomérov, homológov atď., ktoré degradujú po rôznych charakteristických lag obdobiach a pri rôznych kinetických rýchlostiach, čo vedie k „nejasným“ podhodnoteným krivkám, takže hodnota úspešnosti 60 % sa v rámci „desaťdňového okna“ nemusí dosiahnuť, ani v prípade, že by každá individuálna molekulárna substancia pri samostatnom testovaní za desať dní dosiahla úroveň > 60 %. Tento jav možno pozorovať aj pri iných komplexných zmesiach.

OPIS METÓDY

Zariadenie

15. Bežné laboratórne zariadenie a:

a) sklenené sérové fľaše hermeticky uzavreté butylovými gumenými zátkami a tesniacimi hliníkovými uzávermi. Odporúčaná veľkosť je 125 ml, pričom celkový objem je približne 160 ml (v tomto prípade by mal známy objem každej fľaše byť 160 ± 1 ml). Menšie nádoby možno použiť, ak výsledky spĺňajú podmienky uvedené v odsekoch 66 a 67;

b) uhlíkový analyzátor alebo iný prístroj (napr. plynový chromatograf) na meranie anorganického uhlíka;

▼M4

c) striekačky s vysokou presnosťou na plynné a kvapalné vzorky;

d) orbitálna trepačka v prostredí s kontrolovanou teplotou;

e) prívod vzduchu bez obsahu CO_2 – môže sa pripraviť púšťaním vzduchu cez granule nátronového vápna alebo použitím plynnej zmesi 80 % N_2/20 % 0_2 (nepovinné) (pozri odsek 28);

f) membránové filtračné zariadenie s pórovitosťou 0,20 – 0,45 μm (nepovinné);

g) analyzátor organického uhlíka (nepovinné).

Činidlá

16. Vždy sa používajú analyticky čisté činidlá.

Voda

17. Používa sa destilovaná alebo deionizovaná voda s obsahom celkového organického uhlíka ≤ 1 mg/l. Táto hodnota predstavuje ≤ 5 % počiatočného obsahu organického uhlíka pridaného v odporúčanej dávke testovanej chemikálie.

Zásobné roztoky pre médium s obsahom minerálnych solí

18. Zásobné roztoky a médium s obsahom minerálnych solí sú podobné tým, ktoré sú špecifikované v norme ISO 14593 (16) a v testoch „ľahkej biodegradovateľnosti“ v kapitole C.4 (20). Použitie vyššej koncentrácie chloridu amónneho (2,0 g/l namiesto 0,5 g/l) je nutné iba vo výnimočných prípadoch, napr. ak je koncentrácia testovanej chemikálie > 40 mg C/l. Zásobné roztoky sú uskladnené v chlade a mali by sa zlikvidovať po šiestich mesiacoch alebo skôr, ak vykazujú známky zrážania alebo mikrobiálneho rastu. Pripravia sa tieto zásobné roztoky:

a) dihydrogénfosforečnan draselný (KH_2PO_4) 8,50 g,

hydrogénfosforečnan draselný (K_2HPO_4) 21,75 g,

dihydrát hydrogénfosforečnanu disodného ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g,

chlorid amónny (NH_4Cl) 0,50 g.

Rozpustí sa vo vode a doplní na jeden liter. Hodnota pH tohto roztoku by mala byť 7,4 (± 0,2). Ak tomu tak nie je, pripraví sa nový roztok;

b) dihydrát chloridu vápenatého ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g.

Rozpustí sa vo vode a doplní na jeden liter;

c) heptahydrát síranu horečnatého ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g.

Rozpustí sa vo vode a doplní na jeden liter;

d) chlorid železitý hexahydrát ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g.

Rozpustí sa vo vode a doplní na jeden liter, pričom sa pridá jedna kvapka koncentrovaného roztoku.

Príprava minerálneho média

19. Zmieša sa 10 ml roztoku v písmene a) s približne 800 ml vody (odsek 17), potom sa pridá 1 ml roztokov v písmenách b), c) a d) a doplní vodou (odsek 17) na jeden liter.

Iné činidlá

20. Koncentrovaná kyselina trihydrogénfosforečná (H_3PO_4) (> 85 % hmotnosti na objem).

▼M4

Roztok hydroxidu sodného 7 M

21. V jednom litri vody sa rozpustí 280 g hydroxidu sodného (NaOH) (odsek 17). Určí sa koncentrácia DIC tohto roztoku a táto hodnota sa zohľadní pri výpočte výsledkov testu (pozri odseky 55 a 61), najmä v súvislosti s kritériom platnosti podľa odseku 66 písm. b). Ak je koncentrácia DIC príliš vysoká, pripraví sa nový roztok.

Testovaná chemikália

22. Vo vode (odsek 17) alebo v testovacom médiu (odsek 19) sa pripraví zásobný roztok testovanej chemikálie, ktorá je dostatočne rozpustná vo vode, s koncentráciou pokiaľ možno stokrát vyššou, ako je konečná koncentrácia, ktorá sa použije v teste. Môže byť potrebné upraviť pH zásobného roztoku. Zásobný roztok sa pridá do minerálneho média, aby sa dosiahla konečná koncentrácia organického uhlíka medzi 2 a 40 mg C/l, ideálne 20 mg C/l. Použitie nižších ako uvedených koncentrácií môže mať za následok nižšiu presnosť. Rozpustné a nerozpustné kvapalné chemikálie možno do nádob pridávať priamo pomocou striekačiek s vysokou presnosťou. Slabo rozpustné a nerozpustné testované chemikálie môžu vyžadovať osobitné postupy (25). Možnosti sú tieto:

a) priame pridanie známych odvážených množstiev;

b) ultrazvuková disperzia pred pridaním;

c) disperzia pomocou emulgujúcich činidiel potrebná na zistenie inhibičných alebo stimulačných účinkov na mikrobiálnu činnosť pred pridaním;

d) adsorpcia kvapalnej testovanej chemikálie alebo roztoku vo vhodnom prchavom rozpúšťadle, na inertnom médiu alebo nosnom materiáli (napr. filter zo sklenených vlákien), po ktorej nasleduje odparenie rozpúšťadla, ak sa použilo, a priame pridanie známych množstiev;

e) pridanie známeho objemu roztoku testovanej chemikálie vo vysokoprchavom rozpúšťadle do prázdnej testovacej nádoby a následné odparenie rozpúšťadla.

Činidlá alebo rozpúšťadlá použité v písmenách c), d) a e) je potrebné testovať na zistenie akýchkoľvek stimulačných alebo inhibičných účinkov na mikrobiálnu činnosť [pozri odsek 42 písm. b)].

Referenčná chemikália

23. Vo vode sa pripraví zásobný roztok (rozpustnej) referenčnej chemikálie (odsek 17), s koncentráciou, pokiaľ možno stokrát vyššou, ako je konečná koncentrácia, ktorá sa použije (20 mg C/l) v teste.

Kontrola inhibície

24. Testované chemikálie v podmienkach použitých pri hodnotení ľahkej biodegradácie často nevykazujú významnú degradáciu. Jednou z možných príčin je skutočnosť, že testovaná chemikália v koncentrácii, v ktorej sa aplikuje v teste, má na inokulum inhibičné účinky. Do koncepcie testu sa môže zahrnúť kontrola inhibície s cieľom umožniť identifikáciu (pri spätnom pohľade) inhibície ako možnej príčiny alebo prispievajúceho faktora. Kontrolou inhibície možno prípadne takéto interferencie vylúčiť a preukázať, že nulovú alebo nepatrnú degradáciu možno pripísať výhradne rezistencii voči mikrobiálnemu napadnutiu v podmienkach testu. Na účely získania informácií o toxických účinkoch testovanej chemikálie na (aeróbne) mikroorganizmy sa pripraví roztok v testovacom médiu obsahujúci testovanú chemikáliu a referenčnú chemikáliu (odsek 19), každý v rovnakej koncentrácii, v akej sa pridáva (pozri odsek 22 a 23).

▼M4

Inokulum

25. Inokulum možno získať z rôznych zdrojov: aktivovaný kal, výtok splaškových vôd (nechlórovaný), povrchové vody a pôdy alebo zmes uvedeného (20). Biodegradačnú činnosť zdroja treba skontrolovať pomocou referenčnej chemikálie. Ak sa daný postup použije ako test ľahkej biodegradovateľnosti, bez ohľadu na zdroj by sa nemali použiť mikroorganizmy, ktoré boli predtým exponované testovanej chemikálii.

Upozornenie: Aktivovaný kal, splaškové vody a výtok splaškových vôd obsahujú choroboplodné organizmy a je nutné s nimi zaobchádzať opatrne.

26. Na základe skúseností je optimálny objem inokula taký, ktorý:

— je dostatočný na zabezpečenie primeranej biodegradačnej činnosti,

— degraduje referenčnú chemikáliu o stanovené percento (pozri odsek 66),

— poskytuje 10^2 – 10^5 jednotiek tvoriacich kolónie na mililiter v konečnej zmesi,

— zvyčajne poskytuje koncentráciu 4 mg/l suspendovaných tuhých látok v konečnej zmesi pri použití aktivovaného kalu; môžu sa použiť koncentrácie do 30 mg/l, ale tie môžu významne zvýšiť produkciu CO_2 v slepých kontrolných nádobách (26),

— predstavuje menej ako 10 % počiatočnej koncentrácie organického uhlíka zavedeného testovanou chemikáliou,

— predstavuje vo všeobecnosti 1 – 10 ml inokula na jeden liter testovacieho roztoku.

Aktivovaný kal

27. Odoberie sa čerstvá vzorka aktivovaného kalu z prevzdušňovacej nádrže čističky odpadových vôd alebo z laboratórnej jednotky, ktoré spracúvajú prevažne domáce splaškové vody. V prípade potreby sa cedením odstránia hrubé častice (napr. pomocou cedidla, ktorého oká majú veľkosť 1 mm^2) a kal sa až do použitia uskladňuje v aeróbnych podmienkach.

28. Po odstránení hrubých častíc sa prípadne nechá sedimentovať alebo sa odstredí (napr. 1 100 × g na 10 minút). Supernatantová kvapalina sa zleje. Kal sa môže premyť v minerálnom roztoku. Koncentrovaný kal sa suspenduje v minerálnom médiu s cieľom získať koncentráciu 3 – 5 g suspendovaných tuhých látok/l. Následne sa prevzdušňuje podľa potreby.

29. Kal sa odoberie zo správne pracujúcej čističky. Ak sa musí kal odobrať z vysokostupňovej čističky alebo je možné, že obsahuje inhibítory, mal by sa premyť. Po dôkladnom premiešaní sa sedimentuje alebo odstredí resuspendovaný kal, odstráni sa supernatantová kvapalina a premytý kal znovu suspenduje v ďalšom objeme minerálneho média. Tento postup sa opakuje, kým sa z kalu neodstráni nadbytočný substrát alebo inhibítor.

30. Z úplne resuspendovaného alebo neošetreného kalu sa odoberie vzorka tesne pred použitím na stanovenie suchej hmotnosti suspendovaných tuhých látok.

31. Ďalšou alternatívou je homogenizácia aktivovaného kalu (3 – 5 g suspendovaných tuhých látok/l). Kal sa prevzdušňuje v mixéri Waring dve minúty pri strednej rýchlosti. Zmiešaný kal sa nechá sedimentovať 30 minút, alebo ak je to potrebné, aj dlhšie, a dekantuje sa kvapalinou na nižšie použitie ako inokulum v množstve 10 mg/l minerálneho média.

▼M4

32. Ďalšie zníženie uvoľňovania čistého CO_2 možno dosiahnuť prevzdušňovaním kalu počas noci vzduchom bez obsahu CO_2. Ako inokulum sa v tomto teste použije koncentrácia 4 mg/l tuhých látok aktivovaného kalu (13).

Sekundárny výtok splaškových vôd

33. Inokulum možno prípadne získať zo sekundárneho výtoku čističky alebo z laboratórnej jednotky, ktoré prevažne spracúvajú domáce splaškové vody. Vzorka sa udržiava v aeróbnych podmienkach a použije sa v deň odberu alebo sa podľa potreby aklimatizujte. Výtok sa prefiltruje cez hrubý filter, aby sa odstránili hrubé pevné častice, a odmeria sa hodnota pH.

34. Filtrát sa s cieľom zníženia obsahu IC počas jednej hodiny čerí vzduchom bez obsahu CO_2 [odsek 15 písm. e)], pričom hodnota pH sa udržiava na úrovni 6,5 pomocou kyseliny trihydrogénfosforečnej (odsek 20). Hodnota pH sa zmení na pôvodnú úroveň pomocou hydroxidu sodného (odsek 21) a po približne hodinovej sedimentácii sa odoberie vhodné množstvo supernatantu na inokuláciu. Týmto postupom čerenia sa znižuje obsah IC v inokule. Napríklad ak sa ako inokulum použil maximálny odporúčaný objem filtrovaného čereného výtoku (100 ml) na liter, množstvo IC prítomné v slepých kontrolných nádobách bolo v rozsahu 0,4 – 1,3 mg/l (14), čo predstavuje 2 – 6,5 % C testovanej chemikálie pri 20 mg C/l a 4 – 13 % pri 10 mg C/l.

Povrchové vody

35. Z vhodnej povrchovej vody sa odoberie vzorka. Mala by sa udržiavať v aeróbnych podmienkach a použiť v deň odberu. Vzorka sa podľa potreby koncentruje filtráciou alebo odstredením. Objem inokula, ktoré sa použije v každej testovacej nádobe, by mal spĺňať kritériá uvedené v odseku 26.

Pôda

36. Z maximálnej hĺbky 20 cm pod pôdnym povrchom sa odoberie vzorka vhodnej pôdy. Skôr než sa vzorka pôdy preoseje cez sito s veľkosťou ôk 2 mm, odstránia sa z nej kamene, zvyšky rastlín a bezstavovcov (ak je vzorka príliš mokrá a nie je možné ju ihneď preosiať, čiastočne sa usuší vzduchom, aby sa uľahčilo preosievanie). Vzorka sa udržiava v aeróbnych podmienkach a použije sa v deň odberu. (Ak sa vzorka prenáša vo voľne uviazanom čiernom polyetylénovom vreci, možno ju v tomto vreci skladovať pri teplote 2 – 4 °C až jeden mesiac).

Aklimatizácia inokula

37. Inokulum sa môže aklimatizovať na experimentálne podmienky, ale nie predadaptovať na testovanú chemikáliu. Aklimatizáciou možno znížiť uvoľňovanie čistého CO_2. Aklimatizácia pozostáva z prevzdušňovania aktivovaného kalu po zriedení v testovacom médiu na úroveň 30 mg/l pomocou vlhkého vzduchu bez obsahu CO_2 v trvaní päť až sedem dní pri testovacej teplote.

POSTUP TESTOVANIA

Počet fliaš

38. Počet fliaš [odsek 15 písm. a)] potrebný na test bude závisieť od frekvencie analýz a trvania testu.

39. Odporúča sa analyzovať trojice fliaš po dostatočnom počte časových intervalov, aby sa mohlo určiť desaťdňové okno. Na konci testu sa takisto analyzuje najmenej päť testovacích fliaš [odsek 15 písm. a)] zo súborov fliaš v písmenách a), b) a c) (pozri odsek 42) s cieľom umožniť výpočet 95 % intervalov spoľahlivosti pre strednú hodnotu percentuálnej biodegradácie.

▼M4

Inokulované médium

40. Inokulum sa použije pri koncentrácii 4 mg/l suchých tuhých látok v aktivovanom kale. Tesne pred použitím sa pripraví dostatočne inokulované médium pridaním napríklad 2 ml vhodne upraveného aktivovaného kalu (odseky 27 – 32) s koncentráciou 2 000 mg/l do jedného litra média s obsahom minerálnych solí (odsek 19). Ak sa použije sekundárny výtok splaškových vôd, maximálne 100 ml výtoku (odsek 33) sa pridá do 900 ml média s obsahom minerálnych solí (odsek 19) a zriedi sa médiom na jeden liter.

Príprava fliaš

41. Alikvotné časti inokulovaného média sa rozdelia do paralelných fliaš tak, aby bol pomer priestoru nad kvapalinou ku kvapaline 1: 2 (napr. sa pridá 107 ml do fliaš s kapacitou 160 ml). Možno použiť aj iné pomery, ale treba venovať pozornosť varovaniu uvedenému v odseku 11. Bez ohľadu na použité inokulum je nutné sa uistiť, že inokulované médium je dostatočne premiešané, aby sa zabezpečila jeho rovnomerná distribúcia do fliaš.

42. Pripravia sa súbory fliaš [odsek 15 písm. a)], ktoré obsahujú:

a) testovacie nádoby (označené F_T) obsahujúce testovanú chemikáliu;

b) slepé kontrolné nádoby (označené F_B) obsahujúce iba testovacie médium a inokulum; takisto sa musia pridať všetky chemikálie, rozpúšťadlá, činidlá alebo filtre zo sklenených vlákien, ktoré sa použili na zavedenie testovanej chemikálie do testovacích nádob;

c) nádoby (označené F_C) na kontrolu postupu obsahujúce referenčnú chemikáliu;

d) v prípade potreby nádoby (označené F_I) na kontrolu možných inhibičných účinkov testovanej chemikálie obsahujúce testovanú chemikáliu aj referenčnú chemikáliu v rovnakých koncentráciách (odsek 24) ako vo fľašiach F_T a F_C;

e) nádoby (označené F_S) na kontrolu možnej abiotickej degradácie ako v písmene a) plus 50 mg/l $HgCl_2$ alebo sterilizované inými prostriedkami (napr. v autokláve).

43. Vo vode rozpustné testované chemikálie a referenčné chemikálie sa pridajú ako vodné zásobné roztoky (odseky 22, 23 a 24), aby sa dosiahla koncentrácia 10 – 20 mg C/l.

44. Nerozpustné testované chemikálie a nerozpustné referenčné chemikálie sa pridajú do fliaš rôznymi spôsobmi [pozri odsek 22 písm. a) – e)] podľa charakteru testovanej chemikálie pred alebo po pridaní inokulovaného média v závislosti od metódy aplikácie testovanej chemikálie. Ak sa použije jeden z postupov uvedených v odseku 22 písm. a) – e), potom by sa so slepými fľašami F_B [odsek 42 písm. b)] malo naložiť podobným spôsobom, ale s vylúčením testovanej chemikálie alebo referenčnej chemikálie.

45. Prchavé testované chemikálie sa pomocou mikrostriekačky vstreknú do hermeticky uzavretých fliaš (odsek 47). Dávka sa vypočíta zo vstreknutého objemu a hustoty testovanej chemikálie.

46. Podľa potreby sa do nádob pridá voda, aby bol v každej nádobe rovnaký objem kvapaliny. Treba zabezpečiť, aby pomer priestoru nad kvapalinou ku kvapaline (zvyčajne 1: 2) a koncentrácia testovanej chemikálie boli nastavené tak, aby bol k dispozícii dostatok kyslíka, ktorý umožní úplnú biodegradáciu.

▼M4

47. Všetky fľaše sa potom hermeticky uzatvoria napríklad butylovými gumenými priehradkami a hliníkovými uzávermi. Prchavé testované chemikálie je potrebné pridať v tejto fáze (odsek 45). Na účely monitorovania poklesu koncentrácie DOC testovanej chemikálie a analýz, ktoré sa vykonávajú v nulovom čase pri počiatočnej koncentrácii IC [sterilné kontroly, odsek 42 písm. e)], alebo iných determinantov sa z testovacej nádoby odoberie primeraná vzorka. Testovacia nádoba a jej obsah sa následne zlikviduje.

48. Hermeticky uzavreté fľaše sa umiestnia na rotačnú trepačku [odsek 15 písm. d)] s rýchlosťou pretrepávania, ktorá je dostatočná na to, aby obsahy fliaš ostali dobre premiešané a v suspenzii (napr. 150 – 200 rpm), a následne sa inkubujú v tme pri teplote 20 °C a skladujú pri tejto teplote v rozmedzí ± 1 °C.

Odber vzoriek

49. Systém odberu vzoriek bude závisieť od lag fázy a kinetickej rýchlosti biodegradácie testovanej chemikálie. V deň odberu vzoriek sa fľaše zlikvidujú na účely analýzy, čo by sa malo vykonávať najmenej raz do týždňa alebo častejšie (napr. dvakrát do týždňa), ak sa požaduje úplná krivka degradácie. Z trepačky sa odoberie požadovaný počet paralelných fliaš predstavujúcich F_T, F_B a F_C a, ak sa použili, F_I a F_S (pozri odsek 42). Test zvyčajne trvá 28 dní. Ak z biodegradačnej krivky vyplýva, že sa dosiahol rovnovážny stav pred uplynutím 28 dní, test môže byť ukončený skôr. Z piatich fliaš vyhradených na 28. deň testu sa odoberú vzorky na analýzu a výsledky sa použijú na výpočet limitov spoľahlivosti alebo variačného koeficientu percentuálnej biodegradácie. Z fliaš, ktoré slúžia ako kontroly inhibície a abiotickej degradácie, nie je potrebné odoberať vzorky tak často ako z ostatných fliaš; postačuje deň 1 a deň 28.

Analýza anorganického uhlíka (IC)

50. Produkcia CO_2 vo fľašiach sa zistí tak, že sa odmeria zvýšenie koncentrácie anorganického uhlíka (IC) počas inkubácie. Na meranie množstva IC vyprodukovaného v teste sú k dispozícii dve odporúčané metódy, ktoré sú opísané ďalej. Keďže výsledky týchto metód sa môžu mierne líšiť, v priebehu testu by sa mala použiť iba jedna.

51. Metóda a) sa odporúča, ak médium pravdepodobne obsahuje napríklad zvyšky papiera zo skleneného filtra a/alebo nerozpustnej testovanej chemikálie. Ak nie je k dispozícii uhlíkový analyzátor, možno túto analýzu možno vykonať pomocou plynového chromatografu. Je dôležité, aby mali fľaše počas analýzy plynu v uzavretom priestore nad kvapalinou teplotu, ktorá je rovnaká alebo sa blíži k testovacej teplote. Metóda b) môže byť jednoduchšia pre laboratóriá, ktoré na meranie IC používajú uhlíkový analyzátor. Je dôležité, aby bol roztok hydroxidu sodného (odsek 21), ktorý sa použije na premenu CO_2 na uhličitan, čerstvo pripravený alebo aby bol známy jeho obsah IC, takže bude možné ho zohľadniť pri výpočte výsledkov testu [pozri odsek 66 písm. b)].

Metóda a): acidifikácia na pH < 3

52. Pred každou várkou analýz sa IC analyzátor nakalibruje pomocou vhodného štandardu IC (napr. 1 % hmotnostného CO_2 v N_2). Koncentrovaná kyselina trihydrogénfosforečná (odsek 20) sa vstrekne cez priehradku každej fľaše, z ktorej sa odoberá vzorka, s cieľom znížiť pH média na úroveň < 3 (napr. sa pridá 1 ml do 107 ml testovacieho média). Fľaše sa umiestnia späť do trepačky. Po jednohodinovom pretrepávaní pri testovacej teplote sa fľaše vyberú z trepačky, odoberú sa alikvotné časti (napr. 1 ml) plynu z uzavretého priestoru nad kvapalinou každej fľaše a vstreknú sa do IC analyzátora. Namerané koncentrácie IC sa zaznamenajú v jednotkách mg C/l.

▼M4

53. Princípom tejto metódy je, že po acidifikácii na pH < 3 a vyvážení pri teplote 20 °C je rovnovážna konštanta pre distribúciu CO_2 medzi kvapalnou a plynnou fázou v testovacích fľašiach 1,0 v prípade, že sa meria ako koncentrácia (13). Tento fakt je potrebné pre testovací systém aspoň raz preukázať týmto spôsobom:

Založia sa fľaše obsahujúce 5 a 10 mg/l IC s využitím roztoku bezvodého uhličitanu sodného (Na_2CO_3) vo vode bez obsahu CO_2, ktorý sa pripraví tak, že voda sa pomocou koncentrovanej kyseliny trihydrogénfosforečnej okyslí na pH 6,5 (odsek 20), počas noci sa čerí pomocou vzduchu bez obsahu CO_2 a pomocou alkálie sa jeho pH zvýši na neutrálnu úroveň. Je potrebné zabezpečiť, aby bol pomer objemu uzavretého priestoru nad kvapalinou k objemu kvapaliny rovnaký ako v testoch (napr. 1 : 2). Obsah fliaš sa okyslí a vyváži podľa opisu v odseku 52 a odmeria sa koncentrácia IC v uzavretom priestore nad kvapalinou, ako aj v kvapalnej fáze. Skontroluje sa, či sú tieto dve koncentrácie v rozsahu pokusnej chyby rovnaké. Ak nie sú, pracovník by mal skontrolovať postupy. Túto kontrolu distribúcie IC medzi kvapalnou a plynnou fázou nie je potrebné vykonať počas každého testu. Pravdepodobne ju bude možné vykonať počas kalibrácie.

54. Ak sa meria eliminácia DOC (iba testované chemikálie rozpustné vo vode), vzorky z kvapalnej fázy sa odoberú zo samostatných (neokyslených) fliaš, prefiltrujú sa cez membránu a vstreknú sa do analyzátora DOC. Tieto fľaše možno v prípade potreby použiť pri iných analýzach na meranie primárnej biodegradácie.

Metóda b): premena CO_2 na uhličitan

55. Pred každou várkou analýz sa IC analyzátor nakalibruje pomocou vhodného štandardu, ako je napríklad roztok hydrogénuhličitanu sodného ($NaHCO_3$) vo vode bez obsahu CO_2 (pozri odsek 53) v rozsahu 0 – 20 mg/l ako IC. Roztok hydroxidu sodného (7M, odsek 21) (napr. 1 ml do 107 ml média) sa vstrekne cez priehradku každej fľaše, z ktorej sa odoberajú vzorky, a fľaše sa nechajú pretrepávať pri testovacej teplote jednu hodinu. V prípade všetkých fliaš zlikvidovaných v daný deň sa použije rovnaký roztok NaOH, ale nemusí sa nevyhnutne použiť pri každom odbere vzoriek počas testu. Ak sa v čase každého odberu vzoriek požadujú absolútne hodnoty IC v slepých pokusoch, bude potrebné stanoviť IC roztoku NaOH pri každom použití. Fľaše sa vyberú z trepačky a nechajú sa sedimentovať. Striekačkou sa z každej nádoby odoberú vhodné objemy (napr. 50 – 1 000 µl) kvapalnej fázy. Vzorky sa vstreknú do IC analyzátora a zaznamenajú sa koncentrácie IC. Je potrebné zabezpečiť, aby bol použitý analyzátor správne vybavený na spracovanie zásaditých vzoriek produkovaných pri tejto metóde.

56. Princípom tejto metódy je, že po pridaní alkálie a pretrepaní je koncentrácia IC v uzavretom priestore nad kvapalinou zanedbateľná. Tento fakt je pre testovací systém nutné aspoň raz skontrolovať pomocou štandardov IC, pridaním alkálie, vyvážením a odmeraním koncentrácie IC v uzavretom priestore nad kvapalinou, ako aj v kvapalnej fáze (pozri odsek 53). Koncentrácia v uzavretom priestore nad kvapalinou by sa mala blížiť nule. Túto kontrolu prakticky úplnej absorpcie CO_2 nie je potrebné vykonávať pri každom teste.

57. Ak sa meria eliminácia DOC (iba testované chemikálie rozpustné vo vode), vzorky z kvapalnej fázy sa odoberú zo samostatných fliaš (neobsahujúcich žiadne pridané alkálie), prefiltrujú sa cez membránu a vstreknú sa do analyzátora DOC. Tieto fľaše možno v prípade potreby použiť pri iných analýzach na meranie primárnej biodegradovateľnosti.

▼M4

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Výpočet výsledkov

58. Pri predpoklade stopercentnej mineralizácie testovanej chemikálie na CO_2 sa nadbytočný ThIC vyprodukovaný v slepých kontrolných testoch rovná TOC pridanému do každej testovacej fľaše na začiatku testu, teda:

$$ThIC = TOC$$

Celková hmotnosť (mg) anorganického uhlíka (TIC) v každej fľaši je:

$$TIC = (\text{mg C v kvapaline} + \text{mg C v uzavretom priestore nad kvapalinou}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{rovnica [1]}$$

kde:

V_L = objem kvapaliny vo fľaši (litre),

CL = koncentrácia IC v kvapaline (mg/l ako uhlík),

VH = objem uzavretého priestoru nad kvapalinou (litre),

CH = koncentrácia IC v uzavretom priestore nad kvapalinou (mg/l ako uhlík).

Výpočty TIC pre dve analytické metódy použité na meranie IC v tomto teste sú opísané ďalej v odsekoch 60 a 61. Percentuálna biodegradácia (*% D*) sa v jednotlivých prípadoch vypočíta podľa vzorca:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \quad \text{rovnica [2]}$$

kde:

TIC_t = mg TIC v testovacej fľaši v čase t,

TIC_b = stredná mg TIC v slepých kontrolných fľašiach v čase t,

TOC = mg TOC pridaná do testovacej nádoby na začiatku.

Z príslušných množstiev TIC vyprodukovaných do časov odberu sa vypočíta percentuálna biodegradácia, % D, pre testovacie (F_T), referenčné (F_C) a, ak sú zahrnuté, kontrolné (F_I) fľaše na monitorovanie inhibície.

59. Ak v priebehu testovacieho obdobia došlo k výraznému zvýšeniu obsahu TIC sterilných kontrolných fliaš (F_S), potom možno vyvodiť záver, že došlo k abiotickej degradácii testovanej chemikálie, ktorú treba zohľadniť pri výpočte D v rovnici [2].

Acidifikácia na pH < 3

60. Keďže acidifikácia na pH < 3 a vyvažovanie vedie k vyrovnaniu koncentrácie TIC v kvapalnej a plynnej fáze, stačí odmerať iba koncentráciu IC v plynnej fáze. Teda z rovnice [1] $TIC = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, kde V_B = objem sérovej fľaše.

Premena CO_2 na uhličitan

61. Pri tejto metóde sú výpočty rovnaké ako v rovnici [1], ale zanedbateľné množstvo IC v plynnej fáze sa ignoruje, čiže $V_H \times C_H = 0$ a $TIC = V_L \times C_L$.

▼M4

Vyjadrenie výsledkov

62. Krivka biodegradácie sa získa tak, že sa zakreslí percentuálna biodegradácia, D, v závislosti od času inkubácie a podľa možnosti sa naznačí lag fáza, biodegradačná fáza, desaťdňové okno a rovnovážna fáza, teda fáza, v ktorej sa dosiahla maximálna degradácia a krivka biodegradácie sa vyrovnala. Ak sa pre súbežné testovacie nádoby získajú porovnateľné výsledky F_T (< 20 % rozdiel), zakreslí sa stredná krivka (pozri dodatok 2, obrázok 1), ak nie, krivky sa zakreslia pre každú nádobu. Stanoví sa stredná hodnota percentuálnej biodegradácie v rovnovážnej fáze alebo sa posúdi najvyššia hodnota (napr. keď krivka v rovnovážnej fáze klesá), ale je dôležité zvážiť, či v druhom prípade nejde o odľahlú hodnotu. Táto maximálna úroveň biodegradácie sa v správe o teste uvedie ako „stupeň biodegradácie testovanej chemikálie“. Ak počet testovacích nádob nebol na naznačenie rovnovážnej fázy dostatočný, na výpočet strednej hodnoty sa použijú údaje namerané v posledný deň testu. Táto posledná hodnota, priemer piatich replikátov, slúži na určenie presnosti, s ktorou bola stanovená percentuálna biodegradácia. Do správy sa uvedie aj hodnota získaná na konci desaťdňového okna.

63. Rovnakým spôsobom sa zakreslí krivka pre referenčnú chemikáliu, F_C, a, ak je zahrnutá, pre abiotickú kontrolu eliminácie, F_S, a kontrolu inhibície, F_I.

64. Zaznamenajú sa množstvá TIC prítomné v slepých kontrolných nádobách (F_B), rovnako ako množstvá v bankách F_S (abiotická kontrola), ak takéto nádoby boli zahrnuté do testu.

65. Vypočíta sa D pre nádoby F_I podľa teoretického nárastu IC očakávaného iba v dôsledku referenčnej zložky zmesi. Ak v deň 28 $[(D_{FC}\ (^1) - D_{FI}\ (^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, možno predpokladať, že testovaná chemikália potlačila činnosť inokula, čo mohlo viesť k nízkym hodnotám D_{FT} získaným v podmienkach testu. V takom prípade možno test opakovať s využitím nižšej testovacej koncentrácie a podľa možnosti znížením DIC v inokule a TIC vytvorenej v slepých kontrolných nádobách, lebo nižšia koncentrácia bude mať inak za následok menšiu presnosť metódy. Prípadne možno použiť iné inokulum. Ak je vo fľaši F_S (abiotická) pozorované výrazné zvýšenie (> 10 %) množstva TIC, mohlo dôjsť k abiotickým degradačným procesom.

Platnosť výsledkov

▼M7

66. Test sa považuje za platný, ak:

a) priemerná percentuálna degradácia v nádobách F_C obsahujúcich referenčnú chemikáliu je > 60 % do 14. dňa inkubácie a

b) priemerné množstvo TIC prítomnej v slepých kontrolných nádobách F_B na konci testu je < 3 mg C/l.

Ak tieto limity nie sú splnené, test by sa mal zopakovať s využitím inokula z iného zdroja a/alebo je potrebné preveriť použité postupy. Ak je napríklad problémom vysoká produkcia IC v slepých kontrolných nádobách, treba sa riadiť postupom uvedeným v bodoch 27 až 32.

(1) Percentuálna degradácia v nádobách F_C obsahujúcich referenčnú látku.
(2) Percentuálna degradácia v nádobách F_I.

▼M4

67. Ak testovaná chemikália nedosiahne 60 % ThIC a preukáže sa, že nemá inhibičné účinky (odsek 65), test možno zopakovať pri vyššej koncentrácii inokula (až do 30 mg/l aktivovaného kalu a 100 ml výtoku/l) alebo s využitím inokúl z iných zdrojov, najmä ak bola degradácia v rozsahu 20 – 60 %.

Interpretácia výsledkov

68. Biodegradácia > 60 % ThIC počas desaťdňového okna v tomto teste preukazuje, že testovaná chemikália ja ľahko biodegradovateľná v aeróbnych podmienkach.

69. Ak sa nedosiahne hraničná hodnota 60 % ThIC, stanoví sa hodnota pH v médiách vo fľašiach, ktoré sa neacidifikovali ani nealkalizovali. Hodnota pod 6,5 môže znamenať, že došlo nitrifikácii. V takom prípade je potrebné test zopakovať s tlmivým roztokom vyššej koncentrácie.

Správa o teste

70. Pre každý deň, v ktorom sa odoberali vzorky, sa zostaví tabuľka % D pre každú testovaciu (F_T), referenčnú (F_C) a, ak bola zahrnutá, inhibičnú kontrolnú fľašu (F_I). Ak sa v prípade paralelných fliaš získajú porovnateľné výsledky, zakreslí sa krivka strednej hodnoty % D v závislosti od času. Zaznamená sa množstvo TIC v slepých kontrolných (F_B) a v sterilných kontrolných nádobách (F_S), DOC a/alebo ostatných determinantov a ich percentuálna eliminácia.

71. Stanoví sa stredná hodnota % D v rovnovážnej fáze alebo v prípade, že biodegradačná krivka v rovnovážnej fáze klesá, sa použije najvyššia hodnota a táto hodnota sa v správe uvedie ako „stupeň biodegradácie testovanej chemikálie“. Je dôležité zabezpečiť, aby v druhom prípade najvyššia hodnota nebola odľahlá.

72. Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— bežný názov, chemický názov, číslo CAS, štrukturálny vzorec a významné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— čistota (nečistoty) testovanej chemikálie.

Podmienky testovania:

— odkaz na túto testovaciu metódu,

— opis použitého testovacieho systému (napr. objem nádoby, pomer uzavretého priestoru nad kvapalinou a kvapaliny, metóda miešania atď.),

— aplikácia testovanej chemikálie a referenčnej chemikálie v testovacom systéme: použitá testovacia koncentrácia a množstvo uhlíka dávkované do každej testovacej fľaše, použitie akýchkoľvek rozpúšťadiel,

— údaje o použitom inokule, akomkoľvek predchádzajúcom ošetrení a aklimatizácii,

— inkubačná teplota,

— overenie princípu analýzy IC,

— hlavné charakteristiky použitého IC analyzátora (a všetkých ostatných použitých analytických metód),

— počet replikátov.

Výsledky:

— nespracované údaje a vypočítané hodnoty biodegradovateľnosti v tabuľkovej forme,

▼M4

— graf percentuálnej degradácie v závislosti od času pre testovanú a referenčnú chemikáliu, lag fáza, fáza degradácie, desaťdňové okno a sklon,

— percentuálna eliminácia v rovnováhe, na konci testu a po desaťdňovom okne,

— dôvody pre akékoľvek odmietnutie testovacích výsledkov,

— akékoľvek ďalšie skutočnosti, ktoré majú význam pre použitý postup,

— rozbor výsledkov.

LITERATÚRA

1. Kapitola C.4 tejto prílohy, Stanovenie „ľahkej“ biodegradovateľnosti – test uvoľňovania CO_2 (metóda C.4-C).

2. Sturm, R. N. (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,.Oil Chem Soc. 50: 159 – 167.

3. Larson, R. J. (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153 – 1161.

4. Larson, R. J., Hansmann, M. A., a Bookland, E. A. (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195 – 1210.

5. ISO 9439 (1990; revidované 1999). Kvalita vody. Hodnotenie úplnej aeróbnej biodegradability organických látok vo vodnom prostredí. Skúška tvorby oxidu uhličitého (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, W. E. (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922 – 929.

9. Weytjens, D., Van Ginneken, I., a Painter, H. A. (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801 – 812.

10. Ennis, D. M., a Kramer, A. (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181 – 185.

11. Ennis, D. M., Kramer, A., Jameson, C. W., Mazzoccki, P. H., a Bailey, P. H. (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51 – 53.

12. Boatman, R. J., Cunningham, S. L., a Ziegler, D. A. (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233 – 243.

13. Struijs, J., a Stoltenkamp, J. (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204 – 211.

14. Birch, R. R., a Fletcher, R. J. (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507 – 524.

15. Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W. E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H., a Bontinck, W. J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527 – 1550.

▼**M4**

16. ISO 14593, (1999) Kvalita vody. Hodnotenie úplnej aeróbnej biodegradability organických látok vo vodnom prostredí. Metóda analýzy uvoľneného anorganického uhlíka v uzavretých nádobách (skúška CO_2 headspace)

17. Battersby, N. S. (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, N. S., Ciccognani, D., Evans, M. R., King, D., Painter, H. A., Peterson, D. R., a Starkey, M. (1999). An „inherent“ biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219 – 3235.

20. Kapitola C.4 tejto prílohy, Stanovenie „ľahkej“ biodegradovateľnosti.

21. OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Správa predsedu (M. Hashimoto; MITI) a záverečná správa (M. Kitano a M. Takatsuki; CITI). Paríž.

22. Kapitola C.11 tejto prílohy, Respiračno-inhibičný test aktivovaného kalu.

23. Struijs, J., Stoltenkamp-Wouterse, M. J., a Dekkers, A. L. M. (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319 – 327.

24. EÚ (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, máj 1999, Medmenham, SL7 2HD, Spojené kráľovstvo.

25. ISO 10634 (1996) Kvalita vody. Pokyny na prípravu a spracovanie organických látok málo rozpustných vo vode na následné hodnotenie ich biodegradability vo vodnom prostredí.

▼M4

Dodatok 1

SKRATKY A VYMEDZENIE POJMOV

IC: anorganický uhlík.

$ThCO_2$: teoretický oxid uhličitý (mg) je vypočítané množstvo oxidu uhličitého, ktoré sa vytvorí zo známeho alebo odmeraného obsahu uhlíka v testovanej chemikálii, keď je kompletne mineralizovaná. Je vyjadrený aj ako mg oxidu uhličitého uvoľneného z mg testovanej chemikálie.

DOC: rozpustený organický uhlík je organický uhlík prítomný v roztoku alebo ten, ktorý prechádza cez 0,45-mikrometrový filter alebo ostáva v supernatante po odstredení pri cca. 4 000 g (približne 40 000 m s^{-2}) počas 15 minút.

DIC: rozpustený anorganický uhlík.

ThIC: teoretický anorganický uhlík.

TIC: celkový anorganický uhlík.

Ľahko biodegradovateľné: dohodnutá klasifikácia chemikálií, ktoré prešli cez určité špecifické skríningové testy na úplnú biodegradovateľnosť. Tieto testy sú také prísne, že sa predpokladá, že takéto chemikálie sa budú rýchlo a úplne biodegradovať vo vodnom prostredí v aeróbnych podmienkach.

Desaťdňové okno: desať dní nasledujúcich ihneď po dosiahnutí 10 % degradácie.

Inherentná biodegradovateľnosť: klasifikácia chemikálií, pre ktoré existuje jednoznačný dôkaz ich biodegradácie (primárnej alebo úplnej) v každom teste na biodegradovateľnosť.

Úplná aeróbna biodegradácia: úroveň degradácie, ktorá sa dosiahne, keď testovanú chemikáliu úplne spotrebujú mikroorganizmy, čoho výsledkom je tvorba oxidu uhličitého, vody, minerálnych solí a nových mikrobiálnych bunkových zložiek (biomasy).

Mineralizácia: mineralizácia je úplná degradácia organickej chemikálie na CO_2 a H_2O v aeróbnych podmienkach a na CH_4, CO_2 a H_2O v anaeróbnych podmienkach.

Lag fáza: dosiahnutý čas od začiatku testu do aklimatizácie a/alebo prispôsobenia degradujúcich mikroorganizmov a do zvýšenia stupňa biodegradácie testovanej chemikálie alebo organického materiálu na úroveň stanoviteľnosti (napr. 10 % maximálnej teoretickej biodegradácie alebo menej v závislosti od presnosti meracej techniky).

Fáza degradácie: čas od konca lag fázy až po čas, keď sa dosiahne 90 % maximálnej úrovne degradácie.

Rovnovážna fáza: rovnovážna fáza je fáza, v ktorej sa dosiahla maximálna degradácia a v ktorej je krivka biodegradácie vyrovnaná.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

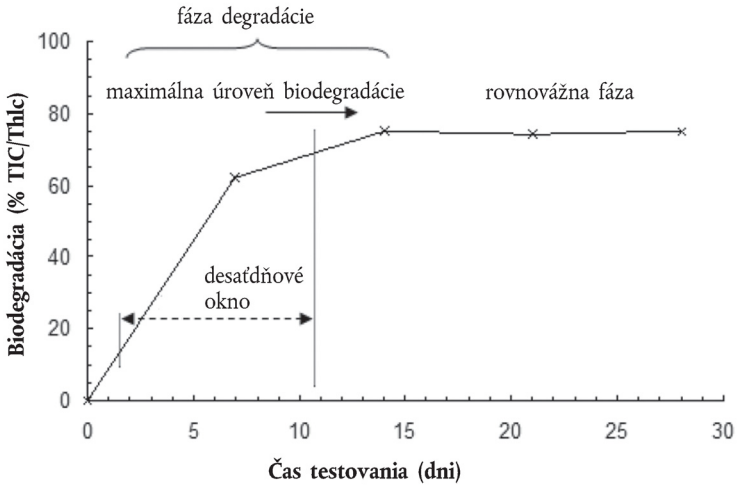
▼M4

Dodatok 2

Príklad krivky biodegradácie

Obrázok 1

Biodegradácia 1-oktanolu v teste CO_2 v uzavretom priestore nad kvapalinou



Glosár

Biodegradácia:

Fáza degradácie:

Maximálna úroveň biodegradácie:

Rovnovážna fáza:

Desaťdňové okno:

Čas testovania (dni):

▼M4

C. 30. BIOAKUMULÁCIA PRI SUCHOZEMSKÝCH MÁLOŠTETINAVCOCH

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov (TG) 317 (2010). Pokiaľ ide o testovacie metódy týkajúce sa environmentálneho osudu, Biokoncentrácia: prietokový rybí test [kapitola C.13 tejto prílohy (49)] bola uverejnená v roku 1996 a Bioakumulácia pri bentických máloštetinavcoch žijúcich v sedimente [kapitola C.51 tejto prílohy (53)] bola uverejnená v roku 2008. Extrapolácia údajov o vodnej bioakumulácii na suchozemské organizmy, ako sú dážďovky, je zložitá, resp. nemožná. Modelové výpočty založené na lipofilite testovanej chemikálie, napr. (14) (37), sa v súčasnosti využívajú na hodnotenie bioakumulácie chemikálií v pôde, ako napríklad v technickom usmerňovacom dokumente EÚ (19). Potrebe testovacej metódy špecifickej pre kompartmenty už bola venovaná pozornosť, napr. (55). Takáto metóda je dôležitá najmä pre hodnotenie sekundárnej otravy v suchozemských potravinových reťazcoch (4). Problému bioakumulácie v organizmoch iných ako ryby sa venuje niekoľko testovacích metód na vnútroštátnej úrovni, napr. (2) a (72). Metódu merania bioakumulácie pri dážďovkách a červoch čeľade *Enchytraeidae* (Eisenia fetida, Savigny) z kontaminovanej pôdy vypracovala Americká spoločnosť pre testovanie a materiály (American Society for Testing and Materials) (3). Medzinárodne uznávaná metóda na stanovenie bioakumulácie v obohatenej pôde prispeje k lepšiemu hodnoteniu rizík chemikálií v suchozemských ekosystémoch, napr. (25) (29).

2. Bezstavovce požívajúce pôdu sú vystavené účinkom chemikálií naviazaných na pôdu. Medzi týmito zvieratami zohrávajú suchozemské máloštetinavce významnú úlohu v štruktúre a funkcii pôdy (15) (20). Suchozemské máloštetinavce žijú v pôde a čiastočne na pôdnom povrchu (najmä v nadložnom horizonte). Často predstavujú najhojnejšie zastúpený živočíšny druh v biomase (54). Tieto zvieratá vzhľadom na bioturbáciu pôdy a skutočnosť, že bývajú častou korisťou, významne ovplyvňujú biodostupnosť chemikálií pre iné organizmy, ako sú dravce patriace do skupiny bezstavovcov [napr. dravé roztoče a chrobáky, napr. (64)] alebo stavovcov (napr. líšky a čajky) (18) (62). Niektoré druhy suchozemských máloštetinavcov, ktoré sa v súčasnosti využívajú v ekotoxikologickom testovaní, sú opísané v dodatku 5.

3. V štandardnej príručke ASTM na vykonávanie laboratórnych testov pôdnej toxicity alebo bioakumulácie pri dážďovkách druhu *Eisenia fetida* a červov čeľade *Enchytraeidae* druhu *Enchytraeus albidus* (3) sa uvádza mnoho základných a užitočných informácií týkajúcich sa postupu tejto testovacej metódy bioakumulácie v pôde. Medzi ďalšie dokumenty, ktoré sú uvedené v tejto testovacej metóde, patrí kapitola C.13 tejto prílohy, Biokoncentrácia: prietokový rybí test (49) a kapitola C.51 tejto prílohy: Bioakumulácia pri bentických máloštetinavcoch žijúcich v sedimente (53). Ďalší významný zdroj informácií o tejto testovacej metóde predstavujú aj praktické skúsenosti so štúdiami bioakumulácie v pôde a publikácie uvedené v literatúre, napr. (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79).

4. Túto testovaciu metódu možno použiť najmä v prípade stabilných, neutrálnych organických chemikálií, ktoré sa zvyčajne adsorbujú na pôde. Pomocou tejto testovacej metódy možno testovať bioakumuláciu stabilných organokovových zlúčenín, ktoré sa viažu na pôdu. Možno ju použiť aj na kovy a iné stopové prvky.

PREDPOKLADANÉ PODMIENKY

5. Testy na meranie bioakumulácie chemikálie pri suchozemských máloštetinavcoch boli vykonané s ťažkými kovmi [pozri napr. (63)] a perzistentnými, organickými chemikáliami s hodnotami log Kow od 3,0 do 6,0, napr. (40). Takéto testy sa vzťahujú aj na:

— chemikálie, ktoré vykazujú nízky log K_{ow} vyšší ako 6,0 (superhydrofóbne chemikálie),

▼M4

— chemikálie patriace do triedy organických chemikálií, o ktorých je známe, že majú potenciál sa bioakumulovať v živých organizmoch, napr. povrchovo aktívne alebo vysokoadsorpčné chemikálie,

— chemikálie, ktoré vykazujú potenciál bioakumulácie vzhľadom na štruktúrne charakteristiky, napr. analógy chemikálií, pri ktorých je známy potenciál bioakumulácie, a

— kovy.

6. Informácie o testovanej chemikálii, ako je bežný názov, chemický názov (podľa možnosti názov IUPAC), štrukturálny vzorec, registračné číslo CAS, čistota, bezpečnostné opatrenia, vhodné podmienky skladovania a analytické metódy, je potrebné získať pred začiatkom štúdie. Okrem toho je nutné poznať tieto informácie:

a) rozpustnosť vo vode;

b) rozdeľovací koeficient oktanol – voda, K_{ow};

c) rozdeľovací koeficient pôda – voda, vyjadrený ako K_{oc};

d) tlak pary;

e) degradovateľnosť (napr. v pôde, vo vode);

f) známe metabolity.

7. Možno použiť rádiooznačené testované chemikálie alebo chemikálie bez rádiooznačenia. Na uľahčenie analýzy sa však odporúča použiť rádiooznačenú testovanú chemikáliu. Rozhodnutie bude závisieť od detekčných limitov alebo od požiadavky na meranie materskej testovanej chemikálie a metabolitov. Ak sa použije rádiooznačená testovaná chemikália a merajú sa celkové rádioaktívne rezíduá, je dôležité, aby sa rádiooznačené rezíduá v pôde aj v testovacích organizmoch charakterizovali prostredníctvom určenia percenta materskej testovanej chemikálie a percenta označenej nematerskej chemikálie, napr. vo vzorkách odobratých v rovnovážnom stave alebo na konci fázy absorpcie, aby bolo možné vypočítať bioakumulačný faktor (BAF) pre danú materskú testovanú chemikáliu a pre metabolity v pôde (pozri odsek 50). Metódu, ktorá je tu opísaná, možno modifikovať, napr. na účely zabezpečenia dostatočnej biomasy, na meranie organickej testovanej chemikálie bez rádiooznačenia alebo v prípade kovov. Ak sa merajú celkové rádioaktívne rezíduá (prostredníctvom kvapalinovej scintilačnej spektroskopie nasledujúcej po extrakcii, horení alebo stabilizácii tkaniva), bioakumulačný faktor je založený na materskej testovanej chemikálii a metabolitoch. Výpočet BAF by podľa možnosti mal vychádzať z koncentrácie materskej testovanej chemikálie v organizmoch a celkových rádioaktívnych rezíduí. Následne sa na účely porovnateľnosti medzi výsledkami rôznych testov bioakumulácie na základe BAF vypočíta akumulačný faktor bioty k pôde (BSAF) normalizovaný na obsah lipidov v červoch a obsah organického uhlíka (OC) v pôde.

8. Toxicita testovanej chemikálie pre živočíšny druh použitý v teste by mala byť známa, napr. účinná koncentrácia (ECx) alebo letálna koncentrácia (LCx) počas fázy absorpcie [napr. (19)]. Vybratá koncentrácia testovanej chemikálie by podľa možnosti mala predstavovať približne 1 % jej akútnej asymptotickej LC_{50} a mala by byť najmenej desaťkrát vyššia ako jej detekčný limit v pôde pri použitej analytickej metóde. Prednostne by sa mali použiť hodnoty toxicity získané z dlhodobých štúdií o subletálnych parametroch, pokiaľ sú k dispozícii (51) (52). Ak takéto údaje nie sú dostupné, užitočné informácie prinesie test akútnej toxicity [pozri napr. (23)].

▼M4

9. Mala by byť k dispozícii vhodná analytická metóda známej správnosti, presnosti a citlivosti na kvantifikáciu chemikálie v testovacích roztokoch, v pôde a v biologickom materiáli, ako aj údaje o príprave a skladovaní vzoriek a karty bezpečnostných údajov o materiáli. Treba poznať aj analytické detekčné limity testovanej látky v pôde a v tkanivách červov. Ak sa použije testovaná chemikália označená 14C, je nutné poznať špecifickú rádioaktivitu (t. j. Bq mol^{-1}) a percento rádioaktivity spojenej s nečistotami. Špecifická rádioaktivita testovanej chemikálie by mala byť dostatočne vysoká, aby umožnila analýzu, a použité testovacie koncentrácie by nemali vyvolávať toxické účinky.

10. Test možno vykonať s využitím umelej alebo prírodnej pôdy. Informácie o charakteristikách použitej prírodnej pôdy, napr. pôvod pôdy alebo jej zložiek, pH, obsah organického uhlíka, rozdelenie veľkosti častíc (percento piesku, siltu a hliny), a retenčná kapacita vody (WHC) by mali byť známe pred začiatkom testu (3) (48).

PRINCÍP TESTU

11. Medzi parametre, ktoré charakterizujú bioakumuláciu testovanej chemikálie, patrí bioakumulačný faktor (BAF), konštanta rýchlosti absorpcie (k_s) a konštanta rýchlosti eliminácie (k_e). Vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 1.

12. Test pozostáva z dvoch fáz: fázy absorpcie (expozícia) a fázy eliminácie (po expozícii). Počas fázy absorpcie sa paralelné skupiny červov vystavia pôsobeniu pôdy, ktorá bola obohatená testovanou chemikáliou. Okrem testovacích zvierat sa za tých istých podmienok bez testovanej chemikálie chovajú skupiny kontrolných červov. Odmeria sa suchá hmotnosť a obsah lipidov v testovacích organizmoch. Na toto meranie možno použiť červy z kontrolnej skupiny. Analytické hodnoty pozadia (slepý test) možno získať analýzou vzoriek kontrolných červov a pôdy. Vo fáze eliminácie sa červy prenesú do pôdy, ktorá neobsahuje testovanú chemikáliu. Fáza eliminácie je nutná vždy okrem prípadu, keď je absorpcia testovanej chemikálie počas fázy expozície bezvýznamná. Fáza eliminácie poskytuje informácie o rýchlosti, ktorou testovacie organizmy vylučujú testovanú chemikáliu [napr. (27)]. Ak sa v priebehu fázy absorpcie nedosiahol rovnovážny stav, stanovenie kinetických parametrov – kinetického bioakumulačného faktora BAFk, konštánt rýchlosti absorpcie a eliminácie – by podľa možnosti malo byť založené na súbežnej úprave výsledkov z fáz absorpcie a eliminácie. Koncentrácia testovanej chemikálie v/na červoch sa monitoruje v priebehu oboch fáz testu.

13. Počas fázy absorpcie sa vykonávajú merania v časoch odberov vzoriek počas až 14 dní (čeľaď *Enchytraeidae*) alebo 21 dní (dážďovky), až kým sa nedosiahne rovnovážny stav (11) (12) (67). Rovnovážny stav nastáva vtedy, keď je krivka závislosti koncentrácie pri červoch od času paralelná s časovou osou a ak sa tri po sebe nasledujúce analýzy vzoriek odobratých v intervaloch najmenej dvoch dní navzájom nelíšia o viac ako ± 20 % na základe štatistických porovnaní (napr. analýza rozptylu, regresná analýza).

14. Fáza eliminácie pozostáva z prenosu testovacích organizmov do nádob obsahujúcich rovnaký substrát bez testovanej chemikálie. Počas fázy eliminácie sa merania vykonávajú v časoch odberov vzoriek počas 14 dní (čeľaď *Enchytraeidae*) alebo 21 dní (dážďovky), pokiaľ skoršie analytické skúmanie nepreukázalo 90-percentné zníženie rezíduí testovanej chemikálie pri červoch. Koncentrácia testovanej chemikálie pri červoch na konci fázy eliminácie sa do správy uvedie ako neeliminované rezíduá. Rovnovážny bioakumulačný faktor (BAFss) sa podľa možnosti vypočíta ako pomer koncentrácie

▼M4

pri červoch (Ca) a v pôde (Cs) pri zrejmom rovnovážnom stave, a ako kinetický bioakumulačný faktor, BAFK, ako pomer konštanty rýchlosti absorpcie z pôdy (ks) a konštanty rýchlosti eliminácie (ke) (pre vymedzenie pojmov pozri dodatok 1) pri predpoklade kinetiky prvého rádu (pre výpočty pozri dodatok 2). Ak je zrejmé, že nie je možné použiť kinetiku prvého rádu, mali by sa použiť iné modely.

15. Konštanta rýchlosti absorpcie, konštanta rýchlosti eliminácie (alebo konštanty, ak boli použité ďalšie modely), kinetický bioakumulačný faktor (BAFK) a podľa možnosti limity spoľahlivosti každého z týchto parametrov sa vypočítajú pomocou počítačových modelových rovníc (pre ďalšie usmernenia pozri dodatok 2). Správnosť odhadu každého modelu možno stanoviť napr. na základe korelačného koeficientu alebo koeficientu určenia (koeficienty blízke hodnote jeden indikujú vysokú mieru zhody) alebo na základe chí-kvadrátu. Takisto veľkosť štandardnej chyby alebo limit spoľahlivosti blízko odhadovaných parametrov môžu indikovať správnosť odhadu modelu.

16. Na zníženie variability výsledkov testu v prípade testovaných chemikálií s vysokou lipofilitou by bioakumulačné faktory mali byť vyjadrené vo vzťahu k obsahu lipidov a k obsahu organického uhlíka (kg organického uhlíka (OC) kg^{-1} obsahu lipidov pri červoch). Tento prístup je založený na skutočnosti, že v prípade iektorých chemických tried existuje zrejmá závislosť medzi potenciálom bioakumulácie a lipofilitou, ktorá bola zistená pri rybách (47). Medzi obsahom lipidov pri rybách a bioakumuláciou takýchto chemikálií existuje vzťah. V prípade bentických organizmov boli zistené podobné korelácie, napr. (30) (44). Podobne sa táto korelácia preukázala v prípade suchozemských máloštetinavcov, napr. (5) (6) (7) (14). Ak je k dispozícii dostatok ntkaniva z červov, obsah lipidov v testovacích zvieratách možno určiť na rovnakom biologickom materiáli, aký bol použitý na určenie koncentrácie testovanej chemikálie. Na meranie obsahu lipidov možno prípadne použiť kontrolné zvieratá.

PLATNOSŤ TESTU

17. Ak má byť test platný, musia byť splnené tieto kritériá v prípade kontrolných zvierat, ako aj v prípade ošetrených zvierat:

— na konci testu by celková mortalita počas fázy absorpcie a eliminácie nemala presahovať 10 % (dážďovky) alebo 20 % (červy čeľade *Enchytraeidae*) celkového počtu zavedených červov,

— pri druhoch *Eisenia fetida* a *Eisenia andrei* by strata strednej hmotnosti nameraná na konci fázy absorpcie a na konci fázy eliminácie nemala presahovať 20 % v porovnaní s počiatočnou čerstvou hmotnosťou (f.w.) na začiatku jednotlivých fáz.

OPIS METÓDY

Testovacie druhy

18. Na testovanie bioakumulácie sa odporúča niekoľko druhov suchozemských máloštetinavcov. Najbežnejšie používané druhy *Eisenia fetida* alebo *Eisenia andrei* (čeľaď *Lumbricidae*), alebo *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus cryptícus* alebo *Enchytraeus luxuriosus* (čeľaď *Enchytraeidae*) sú opísané v dodatku 5.

▼M4

Zariadenie

19. V prípade všetkých častí zariadenia treba dbať na to, aby sa predišlo používaniu materiálov, ktoré môžu rozpustiť, adsorbovať testovanú chemikáliu alebo vylúhovať iné chemikálie a mať škodlivé účinky na testovacie zvieratá. Možno použiť štandardné nádoby pravouhlého alebo valcovitého tvaru vyrobené z chemicky inertného materiálu a s primeranou kapacitou, ktorá zodpovedá veľkosti násady, t. j. počtu testovacích červov. Na každé zariadenie, ktoré prichádza do kontaktu s testovacími médiami, možno použiť nerezovú oceľ, umelú hmotu alebo sklo. Testovacie nádoby by mali byť vhodne prikryté, aby sa zabránilo úniku červov, ale zároveň bol zabezpečený dostatočný prívod vzduchu. V prípade chemikálií s vysokým adsorpčným koeficientom, ako sú syntetické pyretroidy, môže byť potrebné posilanizované sklo. V takýchto prípadoch je potrebné zariadenia po skončení pokusu zlikvidovať (49). Je nutné zabrániť úniku rádiooznačených testovaných látok a prchavých chemikálií. Na zachytenie všetkých rezíduí odparených z testovacích nádob by sa mali použiť zachytávače (napr. sklenené fľaše na premývanie plynu) obsahujúce vhodné absorbenty.

Pôda

20. Testovacia pôda by mala mať takú kvalitu, aby umožnila prežívanie a podľa možnosti reprodukciu testovacích organizmov počas celého obdobia aklimatizácie a testovania bez toho, aby sa pri týchto organizmoch prejavil nezvyčajný vzhľad alebo správanie. Červy by sa mali zahrabať do pôdy.

21. Ako substrát v týchto testoch sa odporúča použiť umelú pôdu opísanú v kapitole C.8 tejto prílohy (48). Príprava umelej pôdy pre testy bioakumulácie a odporúčania týkajúce sa skladovania umelej pôdy sú uvedené v dodatku 4. Umelú pôdu vysušenú vzduchom možno až do použitia skladovať pri izbovej teplote.

22. Ako testovacia a/alebo kultivačná pôda však môže slúžiť prírodná pôda z neznečistených miest. V prípade prírodnej pôdy je nutné uviesť aspoň pôvod (miesto odberu), pH, obsah organického uhlíka, rozdelenie veľkosti častíc (percento piesku, siltu a hliny), maximálnu retenčnú kapacitu vody (WHCmax) a percentuálny obsah vody (3). Analýzou pôdy alebo jej zložiek pred použitím možno získať užitočné informácie o znečisťujúcich mikrolátkach. Ak sa použije pôda z poľnohospodárskeho poľa, nemala by byť ošetrovaná výrobkami na ochranu plodín ani hnojivom z ošetrovaných zvierat, ako sú umelé hnojivá, najmenej jeden rok a v prípade organických hnojív najmenej šesť mesiacov pred odberom vzoriek (50). Postupy manipulácie s prírodnou pôdou pred jej použitím v ekotoxikologických testoch s máloštetinavcami v laboratóriu sú opísané v odseku (3). Čas skladovania prírodnej pôdy v laboratóriu by mal byť čo najkratší.

Aplikácia testovanej chemikálie

23. Testovaná chemikália sa pridá do pôdy. Je potrebné zohľadniť fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie. Testovaná chemikália rozpustná vo vode by sa mala pred tým, ako sa zmieša s pôdou, vo vode úplne rozpustiť. Odporúčaný postup obohacovania v prípade testovanej chemikálie, ktorá je slabo rozpustná vo vode, zahŕňa nanesenie testovanej chemikálie na jednu alebo viacero (umelých zložiek) pôdy. Napríklad kremenný piesok alebo jeho časť možno napustiť roztokom testovanej chemikálie vo vhodnom organickom rozpúšťadle, ktorý sa následne odparí do sucha. a Časť s nánosom možno potom zamiešať do mokrej pôdy. Hlavnou výhodou tohto postupu je fakt, že do pôdy sa nedostane žiadne rozpúšťadlo. Ak sa

▼M4

použije prírodná pôda, testovanú chemikáliu možno pridať obohatením časti pôdy vysušenej vzduchom, ako je opísané v prípade umelej pôdy, alebo zamiešaním testovanej chemikálie do mokrej pôdy, pričom ďalším krokom bude odparenie v prípade, že sa použilo činidlo zvyšujúce rozpustnosť. Vo všeobecnosti treba v čo najväčšej možnej miere zabrániť kontaktu mokrej pôdy s rozpúšťadlami. Je možné uvažovať o nasledujúcich možnostiach (3):

— ak sa použije iné rozpúšťadlo ako voda, malo by byť miešateľné s vodou a/alebo by malo byť možné ho odstrániť (napríklad odparením), v dôsledku čoho by v pôde zostala iba testovaná chemikália,

— ak sa použije kontrola rozpúšťadla, negatívna kontrola nie je nutná. Kontrola rozpúšťadla by mala obsahovať najvyššiu koncentráciu rozpúšťadla pridaného do pôdy a malo by sa pri nej použiť rozpúšťadlo z tej istej dávky, aká bola použitá na prípravu zásobného roztoku. Toxicita a prchavosť rozpúšťadla a rozpustnosť testovanej chemikálie vo vybratom rozpúšťadle by mali byť hlavnými kritériami pri výbere vhodného činidla zvyšujúceho rozpustnosť.

24. V prípade chemikálií, ktoré sú slabo rozpustné vo vode a v organických rozpúšťadlách, možno na dosiahnutie želanej testovacej koncentrácie zmiešať 2,0 – 2,5 g jemného kremenného piesku na testovaciu nádobu s určitým množstvom testovanej chemikálie, napr. pomocou trecej misky a paličky. Táto zmes kremenného piesku a testovanej chemikálie sa pridá do predvlhčenej pôdy a dôkladne sa zmieša s primeraným množstvom deionizovanej vody, aby sa získal požadovaný obsah vlhkosti. Konečná zmes sa rozdelí do testovacích nádob. Postup sa opakuje pri každej testovacej koncentrácii a pripraví sa aj vhodná kontrola s 2,0 – 2,5 g jemne zomletého kremenného piesku na testovaciu nádobu.

25. Koncentrácia testovanej chemikálie v pôde sa stanoví po obohatení. Pred zavedením testovacích organizmov je potrebné overiť homogénnu distribúciu testovanej chemikálie do pôdy. Metóda použitá na obohatenie a dôvody pre výber konkrétneho postupu obohacovania sa uvedú do správy (24).

26. Rovnováha medzi pôdnou fázou a fázou pórovej vody by sa podľa možnosti mala stanoviť ešte pred pridaním organizmov. Odporúča sa použiť obdobie štyroch dní pri teplote 20 °C. V prípade mnohých organických chemikálií slabo rozpustných vo vode sa čas potrebný na dosiahnutie skutočnej rovnováhy medzi adsorbovanými a rozpustenými časťami môže počítať na dni alebo mesiace. V závislosti od účelu štúdie, napríklad ak sa napodobňujú podmienky životného prostredia, sa obohatená pôda môže nechať „zrieť“ dlhšie, napr. v prípade kovov počas troch týždňov pri teplote 20 °C (22).

Kultivácia testovacích organizmov

27. Červy sa podľa možnosti chovajú v stálej laboratórnej kultúre. Usmernenia o metódach laboratórnej kultivácie v prípade druhov *Eisenia fetida* a *Eisenia andrei* a druhov čeľade *Enchytraeidae* sú uvedené v dodatku 5 [pozri aj (48) (51) (52)].

28. Červy použité v testoch by nemali mať žiadne badateľné choroby, abnormality a parazity.

VYKONANIE TESTU

29. Testovacie organizmy sú počas fázy absorpcie vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie. Fáza absorpcie by mala trvať 14 dní (*Enchytraeidae*) alebo 21 dní (dážďovky), pokiaľ sa nepreukáže, že bol dosiahnutý rovnovážny stav.

▼M4

30. Vo fáze eliminácie sa červy prenesú do pôdy, ktorá neobsahuje testovanú chemikáliu. Prvá vzorka sa odoberie po 4 – 24 hodinách od začiatku fázy eliminácie. Príklady harmonogramu odberov vzoriek v prípade 21-dňovej fázy absorpcie a 21-dňovej fázy eliminácie sú uvedené v dodatku 3.

Testovacie organizmy

31. V prípade mnohých druhov suchozemských červov čeľade *Enchytraeidae* je individuálna hmotnosť veľmi nízka (napr. 5 – 10 mg čerstvej hmotnosti na jedinca v prípade druhu *Enchytraeus albidus* a ešte menej v prípade druhu *Enchytraeus crypticus* alebo *Enchytraeus luxuriosus*). Na vykonanie meraní hmotnosti a chemickú analýzu môže byť potrebné zozbierať červy z paralelných testovacích nádob (t. j. na získanie jedného analytického výsledku z tkaniva sa použijú všetky červy z paralelnej nádoby). Do každého replikátu sa pridá 20 jedincov *Enchytraeidae*, pričom sa použijú najmenej tri replikáty. Ak je analytický detekčný limit testovanej chemikálie vysoký, môže byť potrebných viac červov. V prípade testovacích druhov s vyššou individuálnou hmotnosťou (*Eisenia fetida* a *Eisenia andrei*) možno použiť paralelné nádoby obsahujúce jedného jedinca.

32. Dážďovky použité v teste by mali mať podobnú hmotnosť (napr. individuálna hmotnosť *Eisenia fetida* a *Eisenia andrei* by mala byť v rozmedzí 250 – 600 mg). Červy čeľade *Enchytraeidae* (napr. *Enchytraeus albidus*) by mali mať dĺžku približne 1 cm. Všetky červy použité v konkrétnom teste by mali pochádzať z rovnakého zdroja a malo by ísť o dospelé zvieratá s klitelom (pozri dodatok 5). Keďže hmotnosť a vek zvieraťa môže mať vplyv na hodnoty BAF (napr. v dôsledku meniaceho sa obsahu lipidov a/alebo prítomnosti vajíčok), tieto parametre je nutné presne zaznamenať a zohľadniť pri interpretácii výsledkov. Okrem toho počas obdobia expozície môže dôjsť k nakladeniu kokónov, čo bude mať takisto vplyv na hodnoty BAF. Pred testom sa odporúča odvážiť podvzorku testovacích červov na odhadnutie strednej čerstvej a suchej hmotnosti.

33. Používa sa vysoký pomer pôdy k červom, aby sa minimalizovalo znižovanie koncentrácie testovanej chemikálie v pôde počas fázy absorpcie. V prípade druhov *Eisenia fetida* a *Eisenia andrei* je minimálne odporúčané množstvo 50 g suchej hmotnosti (d.w.) pôdy na červa a v prípade červov čeľade *Enchytraeidae* minimálne 10 – 20 g d.w. pôdy na testovaciu nádobu. Nádoby by mali obsahovať vrstvu pôdy hrubú 2 – 3 cm (*Enchytraeidae*) alebo 4 – 5 cm (dážďovky).

34. Červy použité v teste sa odoberú z kultúry (napr. červy *Enchytraeidae* pomocou pinzety). Dospelé zvieratá sa prenesú do neošetrenej testovacej pôdy, aby sa aklimatizovali, a kŕmia sa (pozri odsek 36). Ak sa podmienky testovania líšia od podmienok kultivácie, fáza aklimatizácie v trvaní 24 – 72 hodín by mala postačovať, aby sa červy adaptovali na podmienky testovania. Po aklimatizácii sa dážďovky prepláchnu tak, že sa prenesú do sklenených misiek (napr. Petriho misiek) obsahujúcich čistú vodu a následne sa odvážia pred tým, ako sa vložia do testovacej pôdy. Pred vážením treba z červov odstrániť nadbytočnú vodu jemným dotykom o hranu misky alebo opatrným osušením mierne navlhčenou papierovou vreckovkou.

35. Zahrabávanie testovacích organizmov sa pozoruje a zaznamená. V testoch s dážďovkami sa zvieratá (kontrolné a ošetrené) zvyčajne zahrabú do pôdy za niekoľko hodín, čo treba najneskôr do 24 hodín po pridaní červov do testovacích nádob skontrolovať. Ak sa dážďovky nezahrabú do pôdy (napr. viac ako 10 % v priebehu vyše polovice fázy absorpcie), znamená to buď, že podmienky testovania nie sú vhodné, alebo že testovacie organizmy nie sú

▼M4

zdravé. V takom prípade je potrebné test pozastaviť a zopakovať. Červy *Enchytraeidae* žijú najmä v intersticiálnych póroch pôdy a ich integument môže byť často v kontakte s okolitým substrátom iba čiastočne. Predpokladá sa, že expozícia zahrabávajúcich sa a nezahrabávajúcich sa červov *Enchytraeidae* je rovnaká a v prípade, že sa červy nezahrabú, nie je nevyhnutne potrebné test opakovať.

Kŕmenie

36. Ak sa použije pôda s nízkym celkovým obsahom organického uhlíka, je potrebné naplánovať kŕmenie. Ak sa použije umelá pôda, odporúčaná týždenná dávka krmiva (t. j. červy sa kŕmia raz týždenne) je 7 mg sušeného hnoja na g suchej hmotnosti pôdy v prípade dážďoviek a 2 – 2,5 mg zomletých ovsených vločiek na g suchej hmotnosti pôdy v prípade červov *Enchytraeidae* (11). Prvá dávka potravy sa zmieša s pôdou tesne pred pridaním testovacích organizmov. Podľa možnosti sa použije rovnaký druh potravy, aký sa použil v kultúrach (pozri dodatok 5).

Svetlo a teplota

37. Testy sa vykonávajú v kontrolovaných 16/8-hodinových cykloch svetla/tmy, podľa možnosti s intenzitou 400 – 800 lx v priestore testovacích nádob (3). Testovacia teplota by počas celého testu mala byť 20 ± 2 °C.

Testovacie koncentrácie

38. Použije sa jedna koncentrácia. Prípady, keď je potrebná ďalšia koncentrácia (koncentrácie), treba odôvodniť. Ak sa toxicita (ECx) testovanej chemikálie blíži k analytickému detekčnému limitu, na testovanie sa odporúča sa použiť rádiooznačenú chemikáliu s vysokou špecifickou rádioaktivitou. V prípade kovov by koncentrácia mala byť vyššia ako úroveň pozadia v tkanive a pôde.

Replikáty

39. Na kinetické merania (fáza absorpcie a eliminácie) sa pri každom odbere vzorky použijú minimálne tri ošetrené paralelné nádoby. Celkový počet pripravených replikátov by mal byť dostatočný na pokrytie všetkých časov odberu vzoriek vo fáze absorpcie a eliminácie.

40. Na účely biologických pozorovaní a meraní (napr. pomer suchej a čerstvej hmotnosti, obsahu lipidov) a na analýzu koncentrácií v pozadí pri červoch a v pôde musí byť v prípade, že sa nepoužilo iné rozpúšťadlo ako voda, k dispozícii najmenej 12 paralelných nádob negatívnej kontroly (zo štyroch sa vzorka odoberie na začiatku, zo štyroch na konci fázy absorpcie a zo štyroch na konci fázy eliminácie). Ak sa pri aplikácii testovanej chemikálie použije činidlo zvyšujúce rozpustnosť, okrem ošetrených replikátov treba vykonať kontrolu rozpúšťadla (zo štyroch paralelných nádob sa vzorka odoberie na začiatku, zo štyroch na konci fázy absorpcie a zo štyroch na konci fázy eliminácie) obsahujúcu všetky zložky okrem testovanej látky. V tomto prípade možno na nepovinný odber vzorky na konci fázy absorpcie použiť ďalšie štyri paralelné nádoby na negatívnu kontrolu (bez rozpúšťadla). Tieto replikáty možno biologicky porovnať s kontrolou rozpúšťadla s cieľom získať informácie o možnom vplyve rozpúšťadla na testovacie organizmy. Odporúča sa založenie dostatočného počtu ďalších rezervných paralelných nádob (napr. osem) na aplikáciu látky a kontrolu.

▼M4

Frekvencia merania kvality pôdy

41. Hodnota pH pôdy, obsah vlhkosti pôdy a teplota (nepretržitá) v testovacej miestnosti sa odmerajú na začiatku a na konci fázy absorpcie a eliminácie. Raz týždenne sa obsah vlhkosti pôdy skontroluje odvážením testovacích nádob a porovnaním skutočných hmotností s počiatočnými hmotnosťami na začiatku testu. Straty vody treba kompenzovať pridávaním deionizovanej vody.

Odber vzoriek a analýza červov a pôdy

42. Príklad harmonogramu fázy absorpcie a fázy eliminácie v testoch bioakumulácie pri dážďovkách a *Enchytraeidae* je uvedený v dodatku 3.

43. Vzorky pôdy sa z testovacích nádob na účely stanovenia koncentrácie testovanej chemikálie odoberú pred pridaním červov a počas fázy absorpcie a fázy eliminácie. V priebehu testu sa stanovia koncentrácie testovanej chemikálie v červoch a v pôde. Vo všeobecnosti sa merajú celkové koncentrácie pôdy. Nepovinne možno odmerať koncentrácie v pórovej vode. V takom prípade je nutné pred začiatkom štúdie uviesť odôvodnenie a príslušné metódy a zahrnúť ich do správy.

44. Vzorky červov a pôdy sa počas fázy absorpcie a fázy eliminácie odoberú najmenej šesťkrát. Ak sa preukáže stabilita testovanej chemikálie, počet analýz pôdy možno znížiť. Odporúča sa analyzovať najmenej tri replikáty na začiatku a na konci fázy absorpcie. Ak sa koncentrácia v pôde nameraná na konci fázy absorpcie líši od počiatočnej koncentrácie o viac ako 30 %, treba analyzovať aj vzorky pôdy odobraté v iné dni.

45. Červy z daného replikátu sa z pôdy pri každom čase odberu vzorky vyberú (napr. sa na plytkú misku rozotrie pôda z replikátu a červy sa povyberajú pomocou jemnej pinzety) a rýchlo sa prepláchnu vodou v plytkom pohári alebo oceľovej miske. Nadbytočná voda sa odstráni (pozri odsek 34). Červy sa opatrne prenesú do predváženej nádoby a okamžite sa odvážia vrátane obsahu tráviaceho traktu.

46. V prípade dážďoviek (druh *Eisenia*) sa počká jednu noc na vyprázdnenie tráviaceho traktu červov, napr. sa umiestnia na vlhký filtračný papier do prikrytej Petriho misky (pozri odsek 34). Po vyprázdnení sa stanoví hmotnosť červov, aby sa posúdilo možné zníženie biomasy počas testu (pozri kritériá platnosti v odseku 17). Váženie a analýza tkaniva sa v prípade *Enchytraeidae* vykonáva bez vyprázdňovania, lebo je to vzhľadom na malú veľkosť týchto červov technicky náročné. Po stanovení konečnej hmotnosti sa červy okamžite najvhodnejšou metódou usmrtia (napr. pomocou tekutého dusíka alebo zmrazením pri teplotách pod – 18 °C).

47. Vo fáze eliminácie červy nahradia kontaminovaný obsah tráviaceho traktu čistou pôdou. To znamená, že merania pri nevyprázdnených červoch (v tomto kontexte *Enchytraeidae*), z ktorých sa vzorky odoberali tesne pred fázou eliminácie, obsahujú kontaminovanú pôdu v tráviacom trakte. Pri vodných máloštetinavcoch sa predpokladá, že po prvých 4 – 24 hodinách fázy eliminácie sa väčšina kontaminovaného obsahu tráviaceho traktu nahradí čistým sedimentom, napr. (46). Podobné zistenia boli zaznamenané aj pri dážďovkách v štúdiách akumulácie rádiooznačeného kadmia a zinku (78). Pri nevyprázdnených *Enchytraeidae* možno koncentráciu tejto prvej vzorky fázy eliminácie považovať za koncentráciu v tkanive po vyprázdnení tráviaceho traktu. Na zohľadnenie zriedenia koncentrácie testovanej látky nekontaminovanou pôdou počas fázy eliminácie možno hmotnosť obsahu tráviaceho traktu odhadnúť na základe pomeru čerstvej hmotnosti a hmotnosti popola alebo pomeru suchej hmotnosti a hmotnosti popola pri červoch.

▼M4

48. Vzorky pôdy a červov by sa podľa možnosti mali analyzovať ihneď po odobratí (t. j. do jedného až dvoch dní), aby sa predišlo degradácii alebo iným stratám, pričom sa odporúča vypočítať približnú rýchlosť absorpcie a rýchlosť eliminácie v priebehu testu. Ak sa analýza odloží, vzorky by sa mali vhodnou metódou uskladniť, napr. hlbokým zmrazením (≤ – 18 °C).

49. Treba skontrolovať, či presnosť a reprodukovateľnosť chemickej analýzy, ako aj výťažnosť testovanej chemikálie zo vzoriek pôdy a červov vyhovujú danej metóde. V správe sa uvedie extrakčná účinnosť, detekčný limit (LOD) a kvantifikačný limit (LOQ). Podobne treba skontrolovať, či testovaná chemikália nie je prítomná v kontrolných nádobách vo vyšších koncentráciách, ako je koncentrácia v pozadí. Ak je koncentrácia testovanej chemikálie v testovacom organizme Ca pri kontrolných červoch > 0, treba túto skutočnosť pri výpočte kinetických parametrov zohľadniť (pozri dodatok 2). So všetkými vzorkami by sa počas celého testu malo zaobchádzať tak, aby sa minimalizovala kontaminácia a strata (napr. v dôsledku adsorpcie testovanej chemikálie na zariadenie na odber vzoriek).

50. Pri práci s rádiooznačenými testovanými chemikáliami sa môže analyzovať materská chemikália a metabolity. Kvantifikáciou materskej testovanej chemikálie a metabolitov v rovnovážnom stave alebo na konci fázy absorpcie sa získajú dôležité informácie. Vzorky by sa následne mali vyčistiť, aby bolo možné kvantifikovať materskú testovanú chemikáliu samostatne. Ak v analyzovanej vzorke (vzorkách) samotné metabolity presahujú 10 % celkovej rádioaktivity, odporúča sa identifikovať tieto metabolity.

51. Celková výťažnosť a výťažnosť testovanej chemikálie v červoch, v pôde a, ak sa použijú, v zachytávačoch obsahujúcich absorbenty na zadržanie odparenej testovanej chemikálie sa zaznamená a uvedie do správy.

52. Spájanie vzoriek jedincov odobratých z danej testovacej nádoby je prípustné v prípade červov *Enchytraeidae*, ktoré sú menšie ako dážďovky. Ak spájanie vzoriek vedie k zníženiu počtu replikátov, štatistické postupy, ktoré možno použiť pri spracúvaní údajov, budú obmedzenejšie. Ak sa vyžaduje špecifický štatistický postup a významnosť, potom je potrebné do testu zahrnúť primeraný počet paralelných testovacích nádob, aby sa zabezpečilo želané spájanie vzoriek, postup a významnosť.

53. Odporúča sa vyjadriť BAF ako funkciu celkovej suchej hmotnosti a v prípade potreby (t. j. v prípade vysokohydrofóbnych chemikálií) aj ako funkciu obsahu lipidov. Na stanovenie obsahu lipidov sa použijú vhodné metódy (niektoré existujúce metódy – napr. (31) (58) – je potrebné na tento účel upraviť). Tieto metódy využívajú extrakciu zmesou chloroformu a metanolu. S cieľom predísť použitiu chlórovaných rozpúšťadiel by sa mala použiť upravená metóda podľa Bligha a Dyera (9) uvedená v odkaze (17). Keďže rôznymi metódami sa nemusí dospieť k identickým hodnotám, je dôležité uviesť podrobné informácie o použitej metóde. Ak je to možné, t. j. ak je k dispozícii dostatočné množstvo tkaniva z červov, analýza lipidov by sa podľa možnosti mala vykonať na rovnakej vzorke alebo extrakte, aké boli použité na analýzu testovanej chemikálie, lebo lipidy je často nutné z extraktu odstrániť, skôr než ich možno chromatograficky analyzovať (49). Prípadne možno použiť kontrolné zvieratá na meranie obsahu lipidov, ktorý sa následne môže použiť na normalizáciu hodnôt BAF. Pri druhom prístupe je kontaminácia zariadenia testovanou chemikáliou nižšia.

▼M4

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

54. Krivka absorpcie testovanej chemikálie sa získa tak, že sa na aritmetické osi zakreslí jej koncentrácia v/na červoch počas fázy absorpcie v závislosti od času. Ak krivka dosiahne rovnováhu alebo rovnovážny stav (pozri vymedzenie pojmov v dodatku 1), rovnovážny bioakumulačný faktor BAFss sa vypočíta podľa tohto vzorca:

$$\frac{C_a \text{ v rovnovážnom stave alebo na konci fázy absorpcie (stredná)}}{C_s \text{ v rovnovážnom stave alebo na konci fázy absorpcie (stredná)}}$$

C_a je koncentrácia testovanej chemikálie v testovacom organizme,

C_s je koncentrácia testovanej chemikálie v pôde.

55. Ak sa nedosiahne rovnovážny stav, namiesto BAFss sa na základe konštánt rýchlosti určí BAFK týmto spôsobom:

— určí sa akumulačný faktor (BAF_K) ako pomer k_s/k_e,

— rýchlosti absorpcie a eliminácie sa podľa možnosti vypočítajú súbežne (pozri rovnicu 11 v dodatku 2),

— konštanta rýchlosti eliminácie (k_e) sa zvyčajne stanoví podľa krivky eliminácie (t. j. znázornenia koncentrácie testovanej látky v červoch počas fázy eliminácie). Konštanta rýchlosti absorpcie k_s sa potom vypočíta podľa k_e a hodnoty C_a, ktorá je odvodená z krivky absorpcie (opis týchto metód je uvedený v dodatku 2). Prednostným spôsobom stanovovania BAF_K a oboch rýchlostných konštánt k_s a k_e sú nelineárne metódy odhadovania parametrov pomocou počítača. Ak je zrejmé, že eliminácia nie je prvého rádu, potom je potrebné použiť komplexnejšie modely.

Správa o teste

56. Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— všetky dostupné informácie o akútnej alebo dlhodobej toxicite (napr. EC_x, LC_x, NOEC) testovanej chemikálie pre máloštetinavce žijúce v pôde,

— čistota, fyzický charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti, napr. log K_{ow}, rozpustnosť vo vode,

— chemické identifikačné údaje; zdroj testovanej látky, identita a koncentrácia akéhokoľvek použitého rozpúšťadla,

— ak sa použije rádiooznačená testovaná chemikália, presná poloha označených atómov, špecifická rádioaktivita a rádiochemická čistota.

Testovacie druhy:

— vedecký názov, kmeň, pôvod, všetky zásahy uskutočnené pred pokusom, aklimatizácia, vek, rozsah hmotností atď.

▼M4

Podmienky testovania:

— použitý postup testovania,

— typ a charakteristiky osvetlenia a dĺžka svetlej fázy (svetlých fáz),

— koncepcia testu (napr. počet a veľkosť testovacích nádob, hmotnosť pôdy a výška vrstvy pôdy, počet replikátov, počet červov v jednom replikáte, počet testovacích koncentrácií, trvanie fázy absorpcie a fázy eliminácie, frekvencia odberov vzoriek),

— odôvodnenie výberu materiálu testovacej nádoby,

— metóda prípravy a aplikácie testovanej látky, ako aj dôvody pre výber špecifickej metódy,

— nominálne testovacie koncentrácie, priemery hodnôt nameraných v testovacích nádobách a ich smerodajné odchýlky a spôsob, akým sa vypočítali,

— zdroj zložiek umelej pôdy alebo – ak boli použité prírodné médiá – pôvod pôdy, opis všetkých zásahov uskutočnených pred pokusom, výsledky kontrol (prežívanie, tvorba biomasy, reprodukcia), charakteristiky pôdy (pH, celkový obsah organického uhlíka, rozdelenie veľkosti častíc (percento piesku, siltu a hliny), WHC_{max}, percentuálny obsah vody na začiatku a na konci testu a akékoľvek iné uskutočnené merania),

— podrobné informácie o manipulácii so vzorkami pôdy a červov vrátane údajov o príprave, skladovaní, postupoch obohacovania, extrakcii a analytických postupoch (a presnosti) testovanej látky v červoch a v pôde, obsahu lipidov (ak sa meral) a výťažnosti testovanej látky.

Výsledky:

— mortalita kontrolných červov a červov v jednotlivých testovacích nádobách a akékoľvek pozorované nezvyčajné správanie (napr. vyhýbanie sa pôde, chýbajúca reprodukcia v teste bioakumulácie pri *Enchytraeidae*),

— pomer suchej hmotnosti k čerstvej hmotnosti pôdy a testovacích organizmov (užitočné na účely normalizácie),

— čerstvé hmotnosti červov v každom čase odberu vzorky; v prípade dážďoviek, čerstvé hmotnosti na začiatku testu a v každom čase odberu vzorky pred a po vyprázdnení tráviaceho traktu,

— obsah lipidov v testovacích organizmoch (ak bol stanovený),

— krivky znázorňujúce absorpčnú a eliminačnú kinetiku testovanej chemikálie pri červoch a v čase rovnovážneho stavu,

— C_a a C_s (so smerodajnou odchýlkou a rozsahom, ak je to vhodné) pre všetky časy odberov vzoriek (C_a vyjadrené v g kg^{-1} čerstvej a suchej hmotnosti celého tela, C_s vyjadrená v g kg^{-1} čerstvej a suchej hmotnosti pôdy). Ak sa požaduje akumulačný faktor bioty k pôde (BSAF) (napr. na porovnanie výsledkov z dvoch alebo viacerých testov vykonaných so zvieratami s odlišným obsahom lipidov), C_a možno dodatočne vyjadriť ako g kg^{-1} obsahu lipidov v organizme a C_s možno vyjadriť ako g kg^{-1} organického uhlíka (OC) v pôde,

— BAF (vyjadrený v kg pôdy·kg^{-1} červov), konštanta rýchlosti absorpcie pôdy k_s (vyjadrená v g pôdy kg^{-1} červov $deň^{-1}$) a konštanta rýchlosti eliminácie k_e (vyjadrená v $deň^{-1}$), BSAF (vyjadrený v kg pôdy OC kg^{-1} obsahu lipidov pri červoch) možno do správy uviesť dodatočne,

▼M4

— ak sa merajú: percentá materskej chemikálie, metabolitov a viazaných rezíduí (t. j. percento testovanej chemikálie, ktoré nemožno extrahovať pomocou bežných metód extrakcie) zistené v pôde a testovacích zvieratách,

— metódy použité na štatistické analýzy údajov.

Hodnotenie výsledkov:

— súlad výsledkov s kritériami platnosti uvedenými v odseku 17,

— neočakávané alebo nezvyčajné výsledky, napr. neúplná eliminácia testovanej chemikálie z testovacích zvierat.

LITERATÚRA

1. Amorim, M. (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Diplomová práca, Univerzita 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 s.

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., a 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, A. W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1 – 13.

9. Bligh, E. G., a Dyer, W. J. (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, Paríž, 671 s

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, J. M., a Lanno, R. P. (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, D. W., a Markwell, R. D. (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91 – 100.

15. Didden, W. A. M. (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., Holandsko, s. 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, D. R., 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. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 z 18. decembra 2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemických látok (REACH) a o zriadení Európskej chemickej agentúry, o zmene a doplnení smernice 1999/45/ES a o zrušení nariadenia Rady (EHS) č. 793/93 a nariadenia Komisie (ES) č. 1488/94, smernice Rady 76/769/EHS a smerníc Komisie 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES (Ú. v. EÚ L 396, 30.12.2006, s. 1).

20. Edwards, C. A., a Bohlen, P. J. (1996). Biology and ecology of earthworms. Tretie vydanie, Chapman & Hall, Londýn, 426 s

21. Kapitola C.51 tejto prílohy, Bioakumulácia pri bentických máloštetinavcoch žijúcich v sedimente.

22. Egeler, Ph., Gilberg, D., Scheffczyk, A., Moser, Th., a 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 s Dostupné na prevzatie na: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

23. Elmegaard, N., a 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 s.

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). Dizertačná práca, Univerzita 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, D. W., Bell, P. R. F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225 – 1231.

31. 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.

32. Hawker, D. W., a Connell, D. W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701 – 707.

33. Hund-Rinke, K., a 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. V: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59 – 81.

35. ISO 11268-2 (1998) Kvalita pôdy – účinky znečisťujúcich látok na dážďovky (*Eisenia fetida*). Časť 2: Stanovenie účinkov na reprodukciu.

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, P. A., 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, A. C., Hogendoorn, E. A., DeJong, A., Kruitbosch, J. A. W., 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, R. L. J., 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, M. P. M., Bruins, A., De Vries, T. H., Van Straalen, N. M. (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, A. M. (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dizertačná práca, Univerzita Mníchov, 137 s.

44. 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.

45. Marinussen, M. P. J. C., Van der Zee, S. E. A. T. M., De Haan, F. A. M. (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17 – 26.

46. 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 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, Berlín 1990, VCH, Weinheim.

48. Kapitola C.8 tejto prílohy, Toxicita pre dážďovky.

49. Kapitola C.13 tejto prílohy, Biokoncentrácia: prietokový rybí test.

50. Kapitola C.21 tejto prílohy, Pôdne mikroorganizmy: test dusíkovej premeny.

51. Kapitola C.35 tejto prílohy, Test reprodukcie pri *Enchytraeidae*.

52. Kapitola C.36 tejto prílohy, Test reprodukcie pri dážďovkách

53. Kapitola C.51 tejto prílohy: Bioakumulácia pri bentických máloštetinavcoch žijúcich v sedimente.

54. Petersen, H., a Luxton, M. (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287 – 388.

55. Phillips, D. J. H. (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, F. A. (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida.* RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

58. 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.

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., a Moser, Th. (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 s

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, C. A. F. M., Luttik, R., Van De Meent, D., Slooff, W.,Canton, J. H. (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, B. E., Suter, D. W., Beauchamp, J. J., Efroymson, R. A. (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110 – 2120.

64. Schlosser, H.-J., a 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., a Collado, R. (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93 – 100.

▼M4

66. Sims, R. W., a Gerard, B. M. (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. Londýn: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

67. Sousa, J. P., Loureiro, S., Pieper, S., Frost, M., Kratz, W., Nogueira, A. J. A., Soares, A. M. V. M. (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557 – 2563.

68. Spacie, A., a Hamelink, J. L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309 – 320.

69. Stephenson, G. L., Kaushik, A., Kaushik, N. K., Solomon, K. R., Steele, T., Scroggins, R. P. (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, 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.

71. UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation – Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlín.

72. US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Druhé vydanie, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, marec 2000.

73. Van Brummelen, T. C., a Van Straalen, N. M. (1996). Uptake and elimination of benzoa)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277 – 285.

74. Van Gestel, C. A. M. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H., Edwards, P. J., Greig-Smith, P. W., a Heimbach, F.). Intercept Press, Andover (GB).

75. Van Gestel, C. A., a Ma, W.-C. (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023 – 1033.

76. Van Straalen, N. M., Donker, M. H., Vijver, M. G., van Gestel, C. A. M. (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409 – 417.

77. Venter, J. M., a Reinecke, A. J. (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161 – 165.

78. Vijver, M. G., Vink, J. P. M., Jager, T., Wolterbeek, H. T., van Straalen, N. M., van Gestel, C. A. M. (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., a Van Straalen, N. M. (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402 – 406.

▼M4

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Bioakumulácia je zvyšovanie koncentrácie testovanej chemikálie v alebo na organizme vzhľadom na koncentráciu testovanej chemikálie v okolitom médiu. Bioakumulácia je dôsledkom procesov biokoncentrácie a biomagnifikácie (pozri ďalej).

Biokoncentrácia je zvyšovanie koncentrácie testovanej chemikálie v alebo na organizme, ktoré je dôsledkom absorpcie chemikálie výlučne z okolitého média (t. j. prostredníctvom povrchu tela a požitej pôdy), vzhľadom na koncentráciu testovanej chemikálie v okolitom médiu.

Biomagnifikácia je zvyšovanie koncentrácie testovanej chemikálie v alebo na organizme, ktoré je dôsledkom hlavne absorpcie z kontaminovanej potravy alebo koristi, vzhľadom na koncentráciu testovanej chemikálie v potrave alebo koristi. Biomagnifikácia môže viesť k prenosu alebo akumulácii testovanej látky v rámci potravinového reťazca.

Eliminácia testovanej chemikálie je strata tejto chemikálie z tkaniva testovacieho organizmu aktívnymi alebo pasívnymi procesmi, ku ktorým dochádza bez ohľadu na prítomnosť alebo neprítomnosť testovanej látky v okolitom médiu.

Bioakumulačný faktor (BAF) v akomkoľvek čase počas fázy absorpcie tohto testu bioakumulácie je koncentrácia testovanej chemikálie v/na testovacom organizme (C_a v $g \cdot kg^{-1}$ suchej hmotnosti červov) vydelená koncentráciou chemikálie v okolitom médiu (C_s ako $g \cdot kg^{-1}$ suchej hmotnosti pôdy); jednotkou BAF je kg pôdy·kg^{-1} červov.

Rovnovážny bioakumulačný faktor (BAF_{ss}) je BAF v rovnovážnom stave a v priebehu dlhšieho obdobia sa výrazne nemení, pričom koncentrácia testovanej chemikálie v okolitom médiu (C_s ako g kg^{-1} suchej hmotnosti pôdy) je počas tohto obdobia konštantná.

Bioakumulačné faktory vypočítané priamo na základe pomeru konštanty rýchlosti absorpcie pôdy a konštanty rýchlosti eliminácie (k_s a k_e, pozri ďalej) sa označujú ako kinetický bioakumulačný faktor (BAF_K).

Akumulačný faktor bioty k pôde (BSAF) je koncentrácia testovanej chemikálie v/na testovacom organizme normalizovaná na lipidy vydelená koncentráciou testovanej chemikálie v pôde v rovnovážnom stave normalizovanou na organický uhlík. C_a je potom vyjadrená ako $g \cdot kg^{-1}$ obsahu lipidov v organizme a C_s ako $g \cdot kg^{-1}$ organického obsahu pôdy; jednotkou BSAF je kg OC·kg^{-1} lipidov.

Rovnováha alebo **rovnovážny stav** sa vymedzuje ako rovnováha medzi procesmi absorpcie a eliminácie, ku ktorým dochádza súčasne počas fázy expozície. Rovnovážny stav nastáva pri grafickom znázornení závislosti BAF od času vtedy, keď sa priebeh krivky stáva paralelný s časovou osou a tri po sebe idúce analýzy BAF uskutočnené na vzorkách odobratých minimálne v dvojdňových intervaloch sa od seba neodlišujú o viac ako 20 % a ak medzi týmito tromi obdobiami odberu vzoriek neexistujú štatisticky významné rozdiely. V prípade testovaných chemikálie, ktoré sa vstrebávajú pomalšie, sú vhodnejšie intervaly v trvaní sedem dní (49).

Rozdeľovací koeficient organický uhlík – voda (K_{oc}) je pomer koncentrácie chemikálie v/na zlomku pôdy tvorenom organickým uhlíkom a koncentrácie chemikálie vo vode v rovnováhe.

Rozdeľovací koeficient oktanol – voda (K_{ow}) je pomer rozpustnosti chemikálie v n-oktanole a vo vode v rovnováhe, niekedy vyjadrený aj ako P_{ow}. Dekadický logaritmus K_{ow} (log K_{ow}) sa používa na vyjadrenie potenciálu chemikálie na bioakumuláciu vo vodných živočíchoch.

▼M4

Fáza absorpcie alebo expozície je čas, počas ktorého sú testovacie organizmy vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie.

Konštanta rýchlosti absorpcie pôdy (k_s) je číselná hodnota vyjadrujúca rýchlosť zvyšovania koncentrácie testovanej látky v/na testovacom organizme v dôsledku absorpcie z pôdnej fázy; k_s je vyjadrená v g pôdy kg^{-1} červov d^{-1}.

Fáza eliminácie je čas nasledujúci po prenose testovacích organizmov z kontaminovaného média do média bez obsahu testovanej látky, počas ktorého sa skúma eliminácia (alebo čistá strata) chemikálie z testovacích organizmov.

Konštanta rýchlosti eliminácie (k_e) je číselná hodnota vyjadrujúca rýchlosť znižovania koncentrácie testovanej látky v/na testovacom organizme po prenose testovacích organizmov z média obsahujúceho testovanú látku do média bez obsahu testovanej látky; k_e je vyjadrená v d^{-1}.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M4

Dodatok 2

Výpočet parametrov absorpcie a eliminácie

Hlavným parametrom testu bioakumulácie je bioakumulačný faktor, BAF. Meraný BAF možno vypočítať tak, že koncentrácia v testovacom organizme, C_a, sa vydelí koncentráciou v pôde, C_s, v rovnovážnom stave. Ak sa počas fázy absorpcie nedosiahne rovnovážny stav, BAF_K sa vypočíta z konštánt rýchlosti, nie z BAFss. Treba však uviesť, či je BAF založený na koncentráciách v rovnovážnom stave alebo nie.

Zvyčajným prostriedkom stanovovania kinetického bioakumulačného faktora (BAF_K), konštanty rýchlosti absorpcie pôdy (k_s) a konštanty rýchlosti eliminácie (k_e) je použitie nelineárnych metód odhadovania parametrov na počítači, napr. na základe modelov opísaných v odkaze (68). Vzhľadom na súbor sekvenčných údajov o koncentrácii v závislosti od času a modelové rovnice:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[rovnica 1]}$$

alebo

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[rovnica 2]}$$

kde

C_a = koncentrácia chemikálie v červoch [g kg^{-1} čerstvej alebo suchej hmotnosti],

k_s = konštanta rýchlosti absorpcie v tkanivách [g pôdy kg^{-1} červov d^{-1}],

C_s = koncentrácia chemikálie v pôde [g kg^{-1} čerstvej alebo suchej hmotnosti],

k_e = konštanta rýchlosti eliminácie [d^{-1}],

t_c = čas na konci fázy absorpcie,

tieto počítačové programy počítajú hodnoty BAF_K, k_s a k_e.

Ak sa koncentrácia v pozadí pri neexponovaných červoch, napr. v deň 0, výrazne líši od nuly (to môže nastať napr. v prípade kovov), daná koncentrácia v pozadí ($C_{a,0}$) by sa mala zahrnúť do týchto rovníc, ktoré budú mať takúto podobu:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[rovnica 3]}$$

a

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[rovnica 4]}$$

V prípadoch, keď je pozorovaný výrazný priebežný pokles koncentrácie testovacej chemikálie v pôde počas fázy absorpcie, možno použiť tieto modely, napr. (67) (79):

$$C_s = C_0(e^{-k}0^{t}) \qquad \text{[rovnica 5]}$$

▼M4

kde

C_s = koncentrácia chemikálie v pôde [g kg^{-1} čerstvej alebo suchej hmotnosti],

k_0 = konštanta rýchlosti degradácie v pôde [d^{-1}],

C_0 = počiatočná koncentrácia chemikálie v pôde [g kg^{-1} čerstvej alebo suchej hmotnosti],

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[rovnica 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[rovnica 7]}$$

kde

C_a = koncentrácia chemikálie v červoch [g kg^{-1} čerstvej alebo suchej hmotnosti],

k_s = konštanta rýchlosti absorpcie v tkanivách [g pôdy kg^{-1} červov d^{-1}],

k_0 = konštanta rýchlosti degradácie v pôde [d^{-1}],

k_e = konštanta rýchlosti eliminácie [d^{-1}],

t_c = čas na konci fázy absorpcie.

Ak sa počas fázy absorpcie dosiahne rovnovážny stav (t. j. $t = \infty$), rovnicu 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[rovnica 1]}$$

možno zredukovať na:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

alebo

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[rovnica 8]}$$

Potom k_s/k_e x C_s je prístup ku koncentrácii testovanej látky v tkanivách červov v rovnovážnom stave ($C_{a,ss}$).

Akumulačný faktor bioty k pôde (BSAF) možno vypočítať takto:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[rovnica 9]}$$

kde f_{oc} je frakcia pôdneho organického uhlíka a f_{lip} je frakcia lipidov z červov, podľa možnosti obe stanovené zo vzoriek odobratých počas testu a na základe suchej hmotnosti alebo čerstvej hmotnosti.

Kinetiku eliminácie možno modelovať na základe údajov z fázy eliminácie a s využitím tejto modelovej rovnice a počítačovej metódy odhadovania nelineárnych parametrov. Ak dátové body zakreslené v závislosti od času poukazujú na konštantný exponenciálny pokles koncentrácie testovanej látky pri zvieratách, na opísanie časového priebehu eliminácie možno použiť jednokompartmentový model (rovnica 9).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[rovnica 10]}$$

▼**M4**

Procesy eliminácie sa niekedy javia ako dvojfázové, pričom počas počiatočných fáz vykazujú rýchly pokles C_a, ktorý prechádza v pomalšiu stratu testovaných látok v neskorších fázach eliminácie, napr. (27) (68). Dve fázy možno interpretovať s využitím predpokladu, že v organizme, z ktorého sa testovaná látka stráca rôznymi rýchlosťami, existujú dva rôzne kompartmenty. V týchto prípadoch je potrebné si preštudovať konkrétnu literatúru, napr. (38) (39) (40) (78).

Pomocou uvedených modelových rovníc možno kinetické parametre (k_s a k_e) vypočítať aj v jednom kole použitím modelu kinetiky prvého rádu na všetky údaje z fázy absorpcie aj eliminácie súčasne. Opis metódy, ktorá umožňuje takýto kombinovaný výpočet konštánt rýchlostí absorpcie a eliminácie, možno nájsť v odkazoch 41, 73 a 70.

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{[rovnica 11]}$$

Poznámka: Ak sa parametre absorpcie a eliminácie odhadujú súčasne z kombinovaných údajov o absorpcii a eliminácii, premenná „m“ uvedená v rovnici 11 je deskriptor, ktorý umožňuje počítačovému programu priradiť podpojmy rovnice k súborom údajov z príslušnej fázy a vykonať správne hodnotenie (m = 1 pre fázu absorpcie; m = 2 pre fázu eliminácie).

Tieto modelové rovnice by sa však mali používať opatrne, najmä ak počas testu dôjde k zmenám v biodostupnosti alebo (bio)degradácie testovanej chemikálie [pozri napr. (79)].

▼**M4**

Dodatok 3

PRÍKLADY HARMONOGRAMOV TESTOV BIOAKUMULÁCIE V PÔDE

Test s dážďovkami

a) Fáza absorpcie s použitím ôsmich dní odberu vzoriek na výpočet kinetiky

Deň	Činnosť
– 6	aklimatizácia pripravenej pôdy počas 48 h;
– 4	obohatenie pôdnej frakcie s roztokom testovanej chemikálie; odparenie akéhokoľvek rozpúšťadla; miešanie pôdnych zložiek; rozdelenie pôdy do testovacích nádob; vyvažovanie v testovacích podmienkach počas štyroch dní (troch týždňov v prípade pôdy obohatenej kovmi);
– 3 až – 1	separácia testovacích organizmov z kultúry na aklimatizáciu; príprava a zvlhčovanie pôdnych zložiek;
0	meranie teploty a pH pôdy; odstránenie pôdnych vzoriek z ošetrených nádob a kontrol rozpúšťadla na stanovenie koncentrácie testovanej chemikálie; pridanie prídelu potravy; váženie a náhodné rozdelenie červov do testovacích nádob; zachovanie dostatočných podvzoriek červov na stanovenie analytických hodnôt pozadia, čerstvej a suchej hmotnosti a obsahu lipidov; váženie všetkých testovacích nádob na kontrolu vlhkosti pôdy; kontrola prívodu vzduchu, ak sa používa uzavretý testovací systém;
1	kontrola prívodu vzduchu, zaznamenanie správania červov a teploty; odber vzoriek pôdy a červov na stanovenie koncentrácie testovanej látky;
2	rovnako ako deň 1;
3	kontrola prívodu vzduchu, správania červov a teploty;
4	rovnako ako deň 1;
5 – 6	rovnako ako deň 3;
7	rovnako ako deň 1; pridanie prídelu potravy; kontrola vlhkosti pôdy opätovným odvážením testovacích nádob a kompenzáciou odparenej vody;
8 – 9	rovnako ako deň 3;
10	rovnako ako deň 1;
11 – 13	rovnako ako deň 3;
14	rovnako ako deň 1; pridanie prídelu potravy; kontrola vlhkosti pôdy opätovným odvážením testovacích nádob a kompenzáciou odparenej vody;
15 – 16	rovnako ako deň 3;
17	rovnako ako deň 1;
18 – 20	rovnako ako deň 3;

▼**M4**

Deň	Činnosť
21	rovnako ako deň 1; meranie teploty a pH pôdy; kontrola vlhkosti pôdy opätovným odvážením testovacích nádob; koniec fázy absorpcie; prenos červov zo zvyšných exponovaných replikátov do nádob obsahujúcich čistú pôdu pre fázu eliminácie (bez vyprázdnenia tráviaceho traktu); odber vzoriek pôdy a červov z kontrol rozpúšťadla.
	Činnosti pred expozíciou (fáza vyvažovania) by sa mali naplánovať tak, aby boli zohľadnené vlastnosti testovanej chemikálie.
	Činnosti opísané pre deň 3 by sa mali vykonávať denne (aspoň cez pracovné dni).

b) Fáza eliminácie

Deň	Činnosť
– 6	príprava a zvlhčovanie pôdnych zložiek; aklimatizácia pripravenej pôdy počas 48 h;
– 4	miešanie pôdnych zložiek; rozdelenie pôdy do testovacích nádob; inkubácia v testovacích podmienkach počas štyroch dní;
0 (koniec fázy absorpcie)	meranie teploty a pH pôdy; váženie a náhodné rozdelenie červov do testovacích nádob; pridanie prídelu potravy; prenos červov zo zvyšných exponovaných replikátov do nádob obsahujúcich čistú pôdu; odber vzoriek pôdy a červov po 4 – 6 h na stanovenie koncentrácie testovanej chemikálie;
1	kontrola prívodu vzduchu, zaznamenanie správania červov a teploty; odber vzoriek pôdy a červov na stanovenie koncentrácie testovanej chemikálie;
2	rovnako ako deň 1;
3	kontrola prívodu vzduchu, správania červov a teploty;
4	rovnako ako deň 1;
5 – 6	rovnako ako deň 3;
7	rovnako ako deň 1; pridanie prídelu potravy; kontrola vlhkosti pôdy opätovným odvážením testovacích nádob a kompenzáciou odparenej vody;
8 – 9	rovnako ako deň 3;
10	rovnako ako deň 1;
11 – 13	rovnako ako deň 3;
14	rovnako ako deň 1; pridanie prídelu potravy; kontrola vlhkosti pôdy opätovným odvážením testovacích nádob a kompenzáciou odparenej vody;
15 – 16	rovnako ako deň 3;
17	rovnako ako deň 1;

▼M4

Deň	Činnosť
18 – 20	rovnako ako deň 3;
21	rovnako ako deň 1; meranie teploty a pH pôdy; kontrola vlhkosti pôdy opätovným odvážením testovacích nádob; odber vzoriek pôdy a červov z kontrol rozpúšťadla.
	Príprava pôdy pred začiatkom fázy eliminácie by mala byť rovnaká ako pred fázou absorpcie.
	Činnosti opísané pre deň 3 by sa mali vykonávať denne (aspoň cez pracovné dni).

Test s *Enchytraeidae*

a) Fáza absorpcie s použitím ôsmich dní odberu vzoriek na výpočet kinetiky

Deň	Činnosť
– 6	aklimatizácia pripravenej pôdy počas 48 h;
– 4	obohatenie pôdnej frakcie s roztokom testovanej chemikálie; odparenie akéhokoľvek rozpúšťadla; miešanie pôdnych zložiek; rozdelenie pôdy do testovacích nádob; vyvažovanie v testovacích podmienkach počas štyroch dní (troch týždňov v prípade pôdy obohatenej kovmi);
– 3 až – 1	separácia testovacích organizmov z kultúry na aklimatizáciu; príprava a zvlhčovanie pôdnych zložiek;
0	meranie teploty a pH pôdy; odstránenie pôdnych vzoriek z ošetrených nádob a kontrol rozpúšťadla na stanovenie koncentrácie testovanej chemikálie; pridanie prídelu potravy do pôdy; váženie a náhodné rozdelenie červov do testovacích nádob; zachovanie dostatočných podvzoriek červov na stanovenie analytických hodnôt pozadia, čerstvej a suchej hmotnosti a obsahu lipidov; váženie všetkých testovacích nádob na kontrolu vlhkosti pôdy; kontrola prívodu vzduchu, ak sa používa uzavretý testovací systém;
1	kontrola prívodu vzduchu, zaznamenanie správania červov a teploty; odber vzoriek pôdy a červov na stanovenie koncentrácie testovanej látky;
2	rovnako ako deň 1;
3	kontrola prívodu vzduchu, správania červov a teploty;
4	rovnako ako deň 1;
5 – 6	rovnako ako deň 3;
7	rovnako ako deň 1; pridanie prídelu potravy do pôdy; kontrola vlhkosti pôdy opätovným odvážením testovacích nádob a kompenzáciou odparenej vody;
9	rovnako ako deň 1;
10	rovnako ako deň 3;

▼**M4**

Deň	Činnosť
11	rovnako ako deň 1;
12 – 13	rovnako ako deň 3;
14	rovnako ako deň 1; pridanie prídelu potravy do pôdy; meranie teploty a pH pôdy; kontrola vlhkosti pôdy opätovným odvážením testovacích nádob; koniec fázy absorpcie; prenos červov zo zvyšných exponovaných replikátov do nádob obsahujúcich čistú pôdu pre fázu eliminácie (bez vyprázdnenia tráviaceho traktu); odber vzoriek pôdy a červov z kontrol rozpúšťadla.
	Činnosti pred expozíciou (fáza vyvažovania) by sa mali naplánovať tak, aby boli zohľadnené vlastnosti testovanej chemikálie.
	Činnosti opísané pre deň 3 by sa mali vykonávať denne (aspoň cez pracovné dni).

▼M4

Dodatok 4

Umelá pôda – odporúčania týkajúce sa prípravy a skladovania

Keďže prírodné pôdy z konkrétneho zdroja nemusia byť k dispozícii po celý rok a autochtónne organizmy, ako aj prítomnosť znečisťujúcich mikrolátok môže ovplyvniť test, v tomto teste sa odporúča použiť umelý substrát, umelú pôdu podľa kapitoly C.8 tejto prílohy, Toxicita pre dážďovky (48). V takejto pôde môžu prežiť, rásť a rozmnožovať sa viaceré testovacie druhy a je zabezpečená maximálna štandardizácia, ako aj intra- a interlaboratórna porovnateľnosť testovacích a kultivačných podmienok.

Pôdne zložky

Rašelina:	10 %	Rašelinníková rašelina, podľa usmernenia OECD 207 (48)
Kremenný piesok:	70 %	Priemyselný kremenný piesok (vysušený vzduchom); veľkosť častíc: viac ako 50 % častíc by malo mať veľkosť v rozsahu 50 – 200 μm, ale všetky častice by mali byť ≤ 2 mm
Kaolín:	20 %	Obsah kaolinitu ≥ 30 %
Uhličitan vápenatý:	≤ 1 %	$CaCO_3$, rozomletý na prach, chemicky čistý

Obsah organického uhlíka v umelej pôde možno prípadne znížiť, napr. znížením obsahu rašeliny na 4 – 5 % suchej pôdy a zodpovedajúcim zvýšením obsahu piesku. V dôsledku takéhoto zníženia obsahu organického uhlíka sa môžu znížiť možnosti adsorpcie testovanej chemikálie na pôde (organický uhlík) a dostupnosť testovanej chemikálie pre červy sa môže zvýšiť (74). Preukázalo sa, že druhy *Enchytraeus albidus* a *Eisenia fetida* môžu splniť kritéria platnosti týkajúce sa reprodukcie, ak sa testujú v poľných pôdach s nižším obsahom organického uhlíka, napr. 2,7 % (33), 61, a na základe skúseností možno tento výsledok dosiahnuť aj v umelej pôde, ktorá obsahuje 5 % rašeliny.

Príprava

Suché zložky pôdy sa dôkladne zmiešajú (napr. vo veľkokapacitnom laboratórnom miešači). Zložky sa zmiešajú približne týždeň pred začiatkom testu. Zmiešané suché pôdne zložky sa zvlhčia deionizovanou vodou najmenej 48 hodín pred aplikáciou testovanej látky, aby sa vyvážila/stabilizovala kyslosť. Na stanovenie pH zmesi pôdy sa používa roztok 1 M KCl v pomere 1: 5. Ak hodnota pH nie je v požadovanom rozmedzí (6,0 ± 0,5), do pôdy sa pridá dostatočné množstvo $CaCO_3$ alebo sa pripraví nová várka pôdy.

Maximálna retenčná kapacita vody (WHC) umelej pôdy sa určí podľa ISO 11268-2 (35). Najmenej dva dni pred začiatkom testu sa suchá umelá pôda zvlhčí pridaním dostatočného množstva deionizovanej alebo rekonštituovanej vody, aby sa získala približne polovica konečného obsahu vody. Konečný obsah vody by mal predstavovať 40 – 60 % maximálnej WHC. Na začiatku testu sa predvlhčená pôda rozdelí na toľko várok, koľko je testovacích koncentrácií a kontrol použitých v teste, a obsah vlhkosti sa pomocou roztoku testovanej látky a/alebo pridaním deionizovanej alebo rekonštituovanej vody upraví na 40 – 60 % WHC_{max}. Obsah vlhkosti sa stanoví na začiatku a na konci testu (pri teplote 105 °C). Mal by optimálne zodpovedať požiadavkám jednotlivých druhov (obsah vlhkosti možno skontrolovať aj takto: keď sa pôda jemne stlačí v ruke, medzi prstami by sa mali objaviť malé kvapky vody).

▼**M4**

Skladovanie

Suché zložky umelej pôdy možno až do použitia skladovať pri izbovej teplote. Pripravená predvlhčená pôda sa pred obohatením môže skladovať na chladnom mieste počas až troch dní. Je potrebné dbať na to, aby sa minimalizovalo odparovanie vody. Pôda obohatená o testovanú látku by sa mala ihneď použiť, pokiaľ nie sú k dispozícii informácie, podľa ktorých možno konkrétnu pôdu skladovať bez toho, aby to malo vplyv na toxicitu a biodostupnosť testovanej látky. Vzorky obohatenej pôdy sa môžu do analýzy uskladniť v podmienkach odporúčaných pre konkrétnu testovanú látku.

▼M4

Dodatok 5

Odporúčané druhy suchozemských máloštetinavcov na testovanie bioakumulácie z pôdy

Dážďovky

Odporúčaný testovací druh je *Eisenia fetida* (Savigny 1826) patriaci do čeľade *Lumbricidae*. Od roku 1972 sa delí na dva poddruhy [*Eisenia fetida* a *Eisenia andrei* (10)]. Podľa Jaenikeho (36) ide v skutočnosti o dva samostatné druhy. *Eisenia fetida* sa ľahko rozpozná podľa svetlých intersegmentálnych žltých pásikov, zatiaľ čo *Eisenia andrei* má jednotné tmavočervené zafarbenie. Tieto druhy pravdepodobne pochádzajú z oblasti Čierneho mora a v súčasnosti sú rozšírené na celom svete, najmä v antropogénne modifikovaných biotopoch, ako sú haldy kompostu. Oba druhy možno použiť na ekotoxikologické aj bioakumulačné testy.

Eisenia fetida a *Eisenia andrei* sú komerčne dostupné, napr. ako návnady na ryby. V porovnaní s inými dážďovkovitými červami majú krátky životný cyklus, pričom dospelosť dosahujú približne v dvoch až troch mesiacoch (pri izbovej teplote). Ich optimálna teplota je približne 20 – 24 °C. Majú radšej pomerne vlhké substráty s takmer neutrálnym pH a vysokým obsahom organického materiálu. Keďže tieto druhy sa vo veľkej miere využívajú v štandardizovaných ekotoxikologických testoch približne 25 rokov, ich kultivácia je zaužívaná (48) (77).

Oba druhy možno chovať v širokej škále živočíšnych odpadov. Chovné médium, ktoré sa odporúča podľa ISO (35), je zmes konského alebo dobytčieho hnoja a rašeliny v pomere 50: 50. Médium by malo mať hodnotu pH 6 – 7 (regulovaná pomocou uhličitanu vápenatého), nízku iónovú vodivosť (menej ako 6 mS/cm alebo menej ako 0,5 % koncentrácie soli) a nemalo by byť nadmerne kontaminované amoniakom alebo zvieracím močom. Možno použiť aj komerčnú záhradnú pôdu bez prísad alebo umelú pôdu podľa OECD (48) alebo zmes oboch pôd v pomere 50: 50. Substrát by mal byť vlhký, ale nie príliš mokrý. Vhodné sú chovné boxy s objemom 10 – 50 litrov.

Na získanie červov štandardného veku a hmotnosti je najlepšie začať kultiváciou kokónov. Dospelé červy sa preto pridajú do chovného boxu obsahujúceho čerstvý substrát na tvorbu kokónov. Praktické skúsenosti preukázali, že hustota populácie približne 100 dospelých červov na kg substrátu (čerstvá hmotnosť) zabezpečuje dobrú mieru reprodukcie. Po 28 dňoch sa dospelé červy odoberú. Dážďovky vyliahnuté z kokónov sa použijú na testovanie, keď dosiahnu dospelosť, aspoň po dvoch mesiacoch, ale pred uplynutím 12 mesiacov.

Červy opísaných druhov možno považovať za zdravé, keď sa pohybujú v substráte, nesnažia sa opustiť substrát a priebežne sa rozmnožujú. Veľmi pomalý pohyb alebo žltá zadná časť (v prípade *Eisenia fetida*) znamená vyčerpanie substrátu. V takom prípade sa odporúča čerstvý substrát a/alebo nižší počet zvierat v boxe.

Ďalšie vybraté odkazy

Gerard, B. M. (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. Londýn, 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, J. E. (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180 – 201.

▼M4

Sims, R. W., a Gerard, B. M. (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. Londýn 31: 1 – 171.

Tomlin, A. D. (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology – from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, Londýn. 331 – 338 s.

Enchytraeidae

Odporúčaný testovací druh je *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (mrlica biela). *Enchytraeus albidus* je jeden z najväčších (až 15mm) druhov obrúčkavých máloštetinavcov čeľade *Enchytraeidae* a vyskytuje sa na celom svete, napr. (8). *Enchytraeus albidus* sa vyskytuje v morských, sladkovodných a suchozemských biotopoch, najmä v rozkladajúcej sa organickej hmote (morské riasy, kompost) a vzácne na lúkach (42). Táto široká ekologická tolerancia a niektoré morfologické variácie poukazujú na skutočnosť, že môže existovať niekoľko rás tohto druhu.

Enchytraeus albidus je komerčne dostupný, predáva sa ako potrava pre ryby. Treba skontrolovať, či kultúra nie je kontaminovaná inými, zvyčajne menšími druhmi (60). Ak dôjde ku kontaminácii, všetky červy by sa mali premyť vodou v Petriho miske. Veľké dospelé jedince druhu *Enchytraeus albidus* sa následne vyberú (pomocou stereomikroskopu) na založenie novej kultúry. Všetky ostatné červy sa zlikvidujú. Životný cyklus tohto druhu je krátky, keďže dospieva od 33 dní (pri teplote 18 °C) do 74 dní (pri teplote 12 °C). V teste možno použiť iba kultúry, ktoré sa udržiavali v laboratóriu bez problémov počas najmenej piatich týždňov (jedna generácia).

Iné druhy rodu *Enchytraeus* sú takisto vhodné, najmä *Enchytraeus luxuriosus.* Tento druh sa fyziologicky vyskytuje v pôde a najnovšie bol opísaný v odkaze (65). Ak sa použijú iné druhy rodu *Enchytraeus*, musia byť jednoznačne identifikované a do správy sa musí uviesť odôvodnenie výberu daného druhu.

Enchytraeus crypticus (Westheide a Graefe 1992) je druh, ktorý patrí do tej istej skupiny ako *Enchytraeus luxuriosus*. Nebolo s istotou zistené, či sa tento druh vyskytuje v poli, a opísaný bol iba z kultúr dážďoviek a háld kompostu (Römbke 2003). Jeho pôvodné ekologické potreby preto nie sú známe. Najnovšie laboratórne štúdie v rôznych poľných pôdach však potvrdili, že tento druh má vysokú toleranciu voči vlastnostiam pôdy, ako je pH a štruktúra (Jänsch a kol. 2005). V posledných rokoch sa tento druh často používa v ekotoxikologických štúdiách pre jednoduchosť chovu a testovania, napr. Kuperman a kol. 2003). Je však malý (3 – 12 mm; 7 mm v priemere (Westheide a Müller 1996), v dôsledku čoho je manipulácia problematickejšia ako v prípade druhu *Enchytraeus albidus*. Ak sa tento druh použije namiesto *Enchytraeus albidus*, veľkosť testovacej nádoby môže, ale nemusí byť menšia. Okrem toho je potrebné zohľadniť, že tento druh sa veľmi rýchlo rozmnožuje, a generačný čas pri teplote 20 ± 2 °C je menej ako 20 dní (Achazi a kol. 1999) alebo pri vyšších teplotách ešte menej.

Enchytraeidae druhu *Enchytraeus albidus* (ako aj iné druhy rodu *Enchytraeus*) možno chovať vo veľkých umelohmotných boxoch (napr. 30 × 60 × 10 cm alebo 20 × 12 × 8 cm, ktorý je vhodný pre kultúry malých červov) naplnených zmesou umelej pôdy a komerčne dostupnej nekontaminovanej záhradnej pôdy bez prísad. Kompostový materiál by sa nemal používať, lebo môže obsahovať toxické chemikálie, ako sú ťažké kovy. Faunu je potrebné z chovnej pôdy pred použitím odstrániť prostredníctvom hlbokého zmrazenia, ktoré sa vykoná trikrát. Možno použiť aj čistú umelú pôdu, ale miera reprodukcie môže byť pomalšia v porovnaní s mierou, ktorá sa dosiahne pomocou zmiešaných substrátov. Hodnota pH substrátu by mala byť 6,0 ± 0,5. Kultúra je uložená v inkubátore pri teplote 15 ± 2 °C bez svetla. V každom prípade treba zabrániť tomu, aby bola teplota vyššia ako 23 °C. Umelá/prírodná pôda by mala byť vlhká, ale nie mokrá. Keď sa pôda jemne stlačí v ruke, mali by sa objaviť iba malé kvapky vody. V každom prípade treba predchádzať anoxickým podmienkam (napr. ak sa použije veko, počet dier vo veku by mal byť dostatočne vysoký, aby zabezpečoval dostatočnú výmenu vzduchu). Chovná pôda by sa mala raz týždenne prevzdušniť dôkladným miešaním.

▼M4

Červy by sa mali kŕmiť najmenej raz týždenne ad libitum ovsenými otrubami, ktoré sa vložia do dutiny na povrchu pôdy a prikryjú pôdou. Ak v nádobe ostala potrava z posledného dňa kŕmenia, množstvo podávanej potravy by sa malo zodpovedajúco upraviť. Ak na zvyšnej potrave rastú huby, mala by sa nahradiť novým množstvom ovsených vločiek. Na stimuláciu reprodukcie možno ovsené vločky každé dva týždne doplniť komerčne dostupným bielkovinovým práškom s vitamínmi. Po troch mesiacoch sa zvieratá prenesú do čerstvo pripravenej kultúry alebo chovného substrátu. Ovsené otruby, ktoré musia byť uskladnené v hermeticky uzavretých nádobách, sa pred použitím autoklávujú alebo zohrejú, aby sa zabránilo infekciám v dôsledku múčnych roztočov (napr. druh *Glyzyphagus*, *Astigmata*, *Acarina*) alebo dravých roztočov (napr. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*). Po dezinfekcii sa potrava zomelie, aby ju bolo možné ľahko rozsypať po povrchu pôdy. Ďalším možným zdrojom potravy sú pekárske kvasnice alebo potrava pre ryby TetraMin®.

Vo všeobecnosti sú kultivačné podmienky dostatočné, ak sa červy nesnažia opustiť substrát, v pôde sa pohybujú rýchlo, majú lesklý vonkajší povrch bez prilepených častíc pôdy a sú viac-menej do biela zafarbené a ak možno pozorovať červy rôzneho veku. Červy možno v skutočnosti považovať za zdravé, ak sa priebežne rozmnožujú.

Ďalšie vybraté odkazy

Achazi, R. K., 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, M. J. B., Römbke, J. (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51 – 83.

Kuperman, R. G., Checkai, R. T., Simini, M., Phillips, C. T., Kolakowski, J. E., Kurnas, C. W., Sunahara, G. I. (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., a Graefe, U. (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.

Westheide, W., a Müller, M. C. (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263 – 267.

▼M6

C.31. TEST SUCHOZEMSKÝCH RASTLÍN: TEST VZCHÁDZANIA SEMIEN A RASTU SADENÍC

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 208 (2006). Testovacie metódy sa pravidelne revidujú vzhľadom na vedecký pokrok a použiteľnosť na regulačné účely. Táto aktualizovaná testovacia metóda je určená na hodnotenie možných účinkov chemikálií na vzchádzanie semien a rast sadeníc. Nevzťahuje sa na chronické účinky alebo účinky na reprodukciu (t. j. prípravu osiva, tvorbu kvetov, dozrievanie plodov). Posúdiť sa musia podmienky expozície a vlastnosti chemikálie, ktorá sa má testovať, aby sa zabezpečilo použitie vhodných testovacích metód (napr. pri testovaní kovov/kovových zlúčenín by sa mali posúdiť účinky pH a súvisiacich iónov s opačnými nábojmi) (1). Táto testovacia metóda sa nevzťahuje na rastliny vystavené pôsobeniu pár chemikálií. Použiteľná je na testovanie všeobecných chemikálií, biocídov a výrobkov na ochranu plodín (známych aj ako prípravky na ochranu rastlín alebo pesticídy). Metóda bola vyvinutá na základe existujúcich metód uvedených v literatúre pod číslami (2) (3) (4) (5) (6) (7). Uvádzajú sa aj ďalšie odkazy týkajúce sa testovania rastlín pod číslami (8) (9) (10). Vymedzenie použitých pojmov je uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

2. Týmto testom sa hodnotia účinky na rast sadeníc a skorý rast vyšších rastlín po expozícii testovanej chemikálii v pôde (alebo inej vhodnej pôdnej matrici). Semená sa vystavia styku s pôdou s aplikovanou testovanou chemikáliou a hodnotia sa účinky po uplynutí zvyčajne 14 – 21 dní po vzídení sadenice v kontrolnej skupine o 50 %. Meranými konečnými parametrami sú vizuálne posúdenie vzchádzania sadeníc, suchá hmotnosť výhonkov (prípadne čerstvá hmotnosť výhonkov) a v niektorých prípadoch výška výhonku, ako aj posúdenie viditeľných škodlivých účinkov na rôzne časti rastliny. Tieto merania a pozorovania sa porovnávajú s meraniami a pozorovaniami kontrolných rastlín bez aplikovanej chemikálie.

3. V závislosti od očakávaného spôsobu expozície sa testovaná chemikália pridá do pôdy (prípadne do matrice s umelo pripravenou pôdou) alebo sa aplikuje na povrch pôdy, čo primerane reprezentuje potenciálny spôsob expozície chemikálie. Pri pridávaní do pôdy sa chemikália aplikuje do určitého objemu voľnej pôdy. Po aplikácii sa pôda prenesie do nádob a následne sa semená daného rastlinného druhu vysadia do pôdy. Povrchové aplikácie sa robia na pôdu v nádobách, do ktorej boli semená už vysadené. Testovacie jednotky (kontrolné vzorky, vzorky pôdy s aplikovanou chemikáliou a semená) sa následne umiestnia do vhodných podmienok na podporu klíčenia/rastu rastlín.

4. Podľa zámeru štúdie sa test môže vykonať s cieľom zostrojiť krivku závislosti odozvy od dávky, alebo ako limitný test jednej koncentrácie/dávky. Ak výsledky testu jednej koncentrácie/dávky prekročia určitú úroveň toxicity (napr. ak boli zaznamenané väčšie účinky než x %), vykoná sa test na vyhľadávanie rozsahu, ktorým sa stanoví horné a dolné hranice toxicity, a následne sa vykoná viacnásobný test koncentrácie/dávky na vytvorenie krivky závislosti odozvy od dávky. Na získanie hodnôt účinnej koncentrácie EC_x alebo účinnej aplikačnej dávky ER_x (napr. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) pre najcitlivejšie sledovaný parameter, resp. parametre sa používa vhodná štatistická analýza. V rámci tohto testu sa môžu vypočítať aj hodnoty koncentrácie bez pozorovaného účinku (NOEC) a najnižšej koncentrácie s pozorovaným účinkom (LOEC).

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

5. Pri identifikácii očakávaného spôsobu expozície chemikálie a pri navrhovaní testu sú užitočné tieto informácie: štrukturálny vzorec, čistota, rozpustnosť

▼M6

vo vode, rozpustnosť v organických rozpúšťadlách, rozdeľovacia konštanta 1-oktanol/voda, sorpčné vlastnosti pôdy, tlak pary, chemická stabilita vo vode a na svetle a biodegradovateľnosť.

PLATNOSŤ TESTU

6. Na to, aby bol test platný, je potrebné v kontrolných vzorkách splniť tieto kritériá:

— vzchádzanie semien (sadeníc) dosahuje najmenej 70 %,

— sadenice nevykazujú viditeľné fytotoxické účinky (napr. chlorózu, nekrózu, vädnutie, deformácie listov a stoniek) a rastliny vykazujú len rozdiely v raste a morfológii bežné pre daný druh,

— stredná miera prežitia vzídených kontrolných sadeníc počas celej štúdie je najmenej 90 %,

— environmentálne podmienky pre jednotlivé druhy sú rovnaké a rastové médiá obsahujú rovnaké množstvo pôdnej matrice, podporných médií alebo substrátu z rovnakého zdroja.

REFERENČNÁ CHEMIKÁLIA

7. Referenčná chemikália sa môže testovať v pravidelných intervaloch s cieľom overiť, či sa vykonanie testu, reakcia príslušných testovacích rastlín a podmienky testu postupom času výrazne nezmenili. Alternatívne by sa staršie merania množstva biomasy alebo rastu kontrolných vzoriek mohli použiť na hodnotenie výkonnosti testovacieho systému v konkrétnych laboratóriách a môžu slúžiť ako prostriedok kontroly kvality v rámci jednotlivých laboratórií.

OPIS METÓDY

Prirodzená pôda – umelý substrát

8. Rastliny sa môžu pestovať v nádobách v pieskovohlinitej pôde, hlinitopieskovej pôde alebo pieskovoílovitej hline, ktorá obsahuje až 1,5 % organického uhlíka (približne 3 % organickej hmoty). Použiť sa môže aj komerčná záhradkárska zemina alebo syntetická pôdna zmes s obsahom do 1,5 % organického uhlíka. Ílovité pôdy by sa nemali používať, ak je testovaná chemikália známa vysokou afinitou k ílom. Pôda z poľa by sa mala preosiať na veľkosť častíc 2 mm s cieľom zhomogenizovať ju a odstrániť z nej veľké častice. Zaznamenať by sa mal typ a štruktúra konečnej pripravenej pôdy, jej percentuálny obsah organického uhlíka, pH a obsah soli ako parameter elektrónovej vodivosti. Pôda by sa mala klasifikovať podľa štandardnej klasifikačnej schémy (11). Pôda by sa mohla pasterizovať alebo tepelne ošetriť s cieľom znížiť vplyv pôdnych patogénov.

9. Prírodná pôda môže skomplikovať interpretáciu výsledkov a zvýšiť ich premenlivosť v dôsledku premenlivých fyzikálnych/chemických vlastností a mikrobiálnych populácií. Tieto premenné následne menia schopnosť zadržiavania vlhkosti, schopnosť vytvárania chemických väzieb, prevdzušňovanie a obsah živín a stopových prvkov. Okrem premenlivosti týchto fyzikálnych faktorov sa vyskytnú aj zmeny v chemických vlastnostiach, ako je napríklad pH a oxidačno-redukčný potenciál, ktoré môžu ovplyvniť biodostupnosť testovanej chemikálie (12) (13) (14).

10. Umelé substráty sa spravidla nepoužívajú na testovanie výrobkov na ochranu plodín, ale môžu sa použiť na testovanie všeobecných chemikálií, alebo ak je žiaduce, aby sa minimalizovala premenlivosť prírodnej pôdy a zvýšila porovnateľnosť výsledkov testu. Použité substráty by mali byť zložené z inertných materiálov, ktoré minimalizujú interakciu s testovanou chemikáliou, nosným rozpúšťadlom alebo obidvoma. Kyselinou premytý kremenný piesok, minerálna vlna a sklené guľôčky (s priemerom napríklad 0,35 – 0,85 mm) sú

▼M6

vhodné inertné materiály, ktoré minimálne absorbujú testovanú chemikáliu (15), aby sa zabezpečilo, že chemikália bude maximálne dostupná sadenici prostredníctvom koreňa. Medzi nevhodné substráty patria vermikulit, perlit alebo iné vysokoabsorpčné materiály. Na to, aby rastliny netrpeli nedostatkom výživy, mali by sa im dodávať živiny potrebné na ich rast. Ak je to možné, potreba živín by sa mala posúdiť prostredníctvom chemickej analýzy alebo vizuálnym hodnotením kontrolných rastlín.

Kritériá pre výber testovaných druhov

11. Výber druhov by mal byť dostatočne široký, napríklad vzhľadom na ich taxonomickú diverzitu v rastlinnej ríši, ich rozdelenie, hojnosť, osobitné charakteristiky životného cyklu druhov a región prirodzeného výskytu, aby vznikol dostatočne široký rozsah reakcií (8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). Pri výbere by sa mali zohľadniť tieto charakteristiky možných testovacích druhov:

— použité druhy majú jednotné semená, ktoré sú ľahko dostupné zo spoľahlivých štandardných zdrojov osiva, ich klíčenie je konzistentné, spoľahlivé a rovnomerné a rast sadeníc je tiež rovnomerný,

— rastlinu je možné testovať v laboratóriu a môže poskytnúť spoľahlivé a reprodukovateľné výsledky v rámci rôznych testovacích zariadení,

— citlivosť testovacích druhov by mala byť v súlade s reakciami rastlín vystavených účinkom chemikálie v prírodnom prostredí,

— do určitej miery sa využívali v predchádzajúcich testoch toxicity a ich použitie, napríklad v rámci biologických testov herbicídov, skríningových testov ťažkých kovov, stresových testov slanosti alebo minerálov alebo štúdií alelopatie, ukazuje citlivosť na širokú škálu stresových faktorov,

— sú zlučiteľné s rastovými podmienkami testovacej metódy,

— spĺňajú kritériá platnosti testu.

Niektoré v minulosti použité testovacie druhy sú uvedené v dodatku 2 a potenciálne druhy iné ako plodiny v dodatku 3.

12. Počet druhov, ktoré sa majú testovať, závisí od príslušných regulačných požiadaviek, preto nie je uvedený v tejto testovacej metóde.

Aplikácia testovanej chemikálie

13. Chemikália by sa mala aplikovať vo vhodnom nosiči (napr. voda, acetón, etanol, polyetylénglykol, arabská guma, piesok). Testovať sa môžu aj zmesi (pripravené výrobky alebo prípravky), ktoré obsahujú účinné zložky a rozličné pomocné látky.

Pridávanie do pôdy/do umelého substrátu

14. Chemikálie, ktoré sú rozpustné vo vode alebo suspendované vo vode, sa môžu pridať do vody a potom sa roztok zmieša s pôdou pomocou vhodného miešacieho zariadenia. Tento typ testu môže byť vhodný, ak k expozícii chemikálie dochádza cez pôdu alebo cez vodu, ktorá sa nachádza v pôdnych póroch, pričom existujú obavy o prenos koreňmi. Pridaním testovanej chemikálie by sa nemala prekročiť pôdna kapacita retencie vody. Objem pridanej vody by mal byť rovnaký pre každú testovanú koncentráciu, ale mal by byť obmedzený tak, aby nedochádzalo k vytváraniu zhlukov v pôde.

▼M6

15. Chemikálie s nízkou rozpustnosťou vo vode by sa mali rozpustiť vo vhodnom prchavom rozpúšťadle (napr. acetón, etanol) a zmiešať s pieskom. Rozpúšťadlo sa potom môže z piesku odstrániť pomocou prúdu vzduchu za nepretržitého premiešavania piesku. Piesok s aplikovanou chemikáliou sa zmieša s experimentálnou pôdou. Vytvorí sa druhá kontrolná vzorka, do ktorej sa pridá iba piesok a rozpúšťadlo. Do vzoriek s aplikovanou chemikáliou všetkých koncentrácií a do druhej kontrolnej vzorky sa pridá rovnaké množstvo piesku so zamiešaným a následne odstráneným rozpúšťadlom. V prípade tuhých, nerozpustných testovaných chemikálií sa vo vhodnom miešacom zariadení zmieša suchá pôda s chemikáliou. Pôda sa potom pridá do nádob a okamžite sa zasadia semená.

16. Ak sa namiesto pôdy používa umelý substrát, chemikálie, ktoré sú rozpustné vo vode, sa môžu rozpustiť v živnom roztoku tesne pred začiatkom testu. Chemikálie, ktoré nie sú rozpustné vo vode, ale je možné ich suspendovať vo vode pomocou nosiča, ktorým je rozpúšťadlo, by sa mali pridať do živného roztoku s nosičom. Chemikálie, ktoré nie sú rozpustné vo vode a pre ktoré nie je k dispozícii netoxický nosič rozpustný vo vode, by sa mali rozpustiť vo vhodnom prchavom rozpúšťadle. Roztok sa zmieša s pieskom alebo sklenými guľôčkami, vloží do rotačného vákuového zariadenia a odparí, pričom vznikne rovnomerný nános chemikálie na piesku alebo guľôčkach. Pred naplnením nádob by sa mala odvážená časť guľôčok extrahovať rovnakým organickým rozpúšťadlom a testovanou chemikáliou.

Povrchová aplikácia

17. V prípade výrobkov na ochranu plodín sa pri aplikácii testovanej chemikálie často používa striekanie testovacieho roztoku na povrch pôdy. Všetko vybavenie, ktoré sa používa na vykonávanie testov, vrátane zariadenia používaného na prípravu a podávanie testovanej chemikálie, by malo mať takú konštrukciu a kapacitu, aby bolo možné testy s týmto vybavením vykonať presne a s reprodukovateľným pokrytím. Pokrytie by malo byť jednotné na celej ploche pôdy. Je potrebné dbať na to, aby sa zabránilo možnosti adsorbovania chemikálií alebo ich reagovania v styku so zariadením (napr. plastovými rúrkami a lipofilnými chemikáliami alebo oceľovými časťami a prvkami). Testovaná chemikália sa rozstrieka na povrch pôdy tak, aby sa simulovala typická aplikácia postrekom z cisterny. Vo všeobecnosti by sa mal objem rozstriekanej chemikálie pohybovať v rozsahu normálnej poľnohospodárskej praxe a používaných objemov (množstvo vody atď. by sa malo zaznamenať). Typ dýzy by sa mal zvoliť tak, aby sa zabezpečilo rovnomerné pokrytie povrchu pôdy. Ak sa používajú rozpúšťadlá a nosiče, mala by sa vytvoriť druhá skupina kontrolných rastlín, pri ktorých by sa použilo iba rozpúšťadlo/nosič. To nie je potrebné v prípade výrobkov na ochranu plodín, ktoré sa testujú ako prípravky.

Overovanie koncentrácie/dávky testovanej chemikálie

18. Hodnoty koncentrácií/dávok aplikácie sa musia potvrdiť príslušným analytickým overovaním. V prípade rozpustných chemikálií sa všetky testovacie koncentrácie/dávky môžu potvrdiť analýzou najvyššej koncentrácie testovacieho roztoku použitého na test, s dokumentáciou o následnom riedení a o používaní kalibrovaného aplikačného zariadenia (napr. kalibrovaného analytického skla, kalibrovaného postrekovacieho aplikačného zariadenia). V prípade nerozpustných chemikálií sa na overovanie materiálu zlúčeniny musia použiť hmotnosti testovanej chemikálie pridané do pôdy. Ak sa vyžaduje preukázanie homogénnosti, môže byť potrebná analýza pôdy.

POSTUP

Koncepcia testu

19. Semená toho istého druhu sa pestujú v príslušných nádobách. Počet semien zasadených do každej nádoby bude závisieť od druhu rastliny, veľkosti nádoby a trvania testu. Počet rastlín v nádobe by mal zabezpečiť vhodné podmienky na rast a zabrániť preplneniu nádoby v priebehu testu. Maximálna hustota výsadby je približne 3 až 10 semien na 100 cm^2 v závislosti od veľkosti semien. Napríklad do nádoby s priemerom 15 cm sa odporúča

▼M6

zasadiť jednu až dve rastliny kukurice, sóje, rajčiaku, uhorky alebo cukrovej repy, tri rastliny repky alebo hrachu a 5 až 10 semien cibule, pšenice alebo iných malých semien. Počet semien a paralelných nádob (replikát sa vymedzuje ako paralelná nádoba, takže rastliny v rámci tej istej nádoby netvoria replikát) by mal byť primeraný pre optimálnu štatistickú analýzu (21). Je potrebné si uvedomiť, že variabilita bude vyššia v prípade testovaných druhov, v prípade ktorých sa v každej nádobe (replikáte) použije menší počet veľkých semien v porovnaní s testovacím druhom, pri ktorom sa v každej nádobe môže použiť väčší počet malých semien. Zasadením rovnakého počtu semien do každej nádoby sa táto variabilita môže minimalizovať.

20. Kontrolné skupiny sa používajú s cieľom zabezpečiť, aby pozorované účinky boli spájané len s expozíciou testovanej chemikálie alebo sa expozícii testovanej chemikálie pripisovali. Vhodná kontrolná skupina by mala byť v každom ohľade identická s testovacou skupinou, okrem expozície účinkom testovanej chemikálie. V rámci daného testu by všetky testovacie rastliny vrátane kontrolných mali pochádzať z toho istého zdroja. S cieľom predísť ovplyvňovaniu je potrebné náhodné zaraďovanie testovacích a kontrolných nádob.

21. Používať by sa nemali semená obaľované insekticídom alebo herbicídom (t. j. upravené semená). Použitie určitých nesystémových kontaktných fungicídov (napr. kaptánu, tirámu) však niektoré regulačné orgány povoľujú (22). Ak existuje možnosť výskytu patogénov prenášaných semenami, semená sa môžu nakrátko namočiť do slabého, 5 % roztoku chlórnanu, potom sa dôkladne opláchnu v tečúcej vode a vysušia. Žiadne ošetrenie iným výrobkom na ochranu plodín nie je povolené.

Podmienky testu

22. Podmienky testu by sa mali približovať podmienkam potrebným na normálny rast testovacích druhov a odrôd (príklady podmienok testu sú uvedené v dodatku 4). Klíčiace rastliny by sa mali udržiavať správnymi záhradníckymi postupmi v kontrolovanom prostredí komôr, fytotrónov alebo skleníkov. Pri použití rastových zariadení tieto postupy zvyčajne zahŕňajú kontrolu a primerane časté (napr. denné) zaznamenávanie teploty, vlhkosti, koncentrácie oxidu uhličitého, svetla (intenzity, vlnovej dĺžky, fotosynteticky aktívneho žiarenia) a času osvetlenia, spôsobu zavlažovania atď., s cieľom zabezpečiť správny rast rastlín v porovnaní s kontrolnými rastlinami vybratých druhov. Teplota v skleníku by sa mala regulovať prostredníctvom systémov vetrania, vykurovania a/alebo chladenia. Na testovanie v skleníkoch sa vo všeobecnosti odporúčajú tieto podmienky:

— teplota: 22 °C ± 10 °C,

— vlhkosť: 70 % ± 25 %,

— fotoperióda: minimálne 16 hodín svetla,

— svietivosť: 350 ± 50 $\mu E/m^2/s$. Môže byť potrebné doplnkové osvetlenie, ak intenzita klesne pod hodnotu 200 $\mu E/m^2/s$ pri vlnových dĺžkach 400 – 700 nm, s výnimkou určitých druhov, ktorých požiadavky na svetlo sú nižšie.

Podmienky prostredia by sa mali v priebehu štúdie monitorovať a zaznamenávať. Rastliny by sa mali pestovať v nepórovitých plastových alebo glazovaných nádobách s podložkou alebo miskou pod nádobou. Nádoby sa môžu

▼M6

pravidelne premiestňovať s cieľom minimalizovať variabilitu v raste rastlín (vzhľadom na rozdiely v podmienkach testu v rámci rastových zariadení). Nádoby musia byť dostatočne veľké, aby umožnili normálny rast.

23. Pôdne živiny sa môžu podľa potreby dopĺňať, aby sa zachovala vysoká životaschopnosť rastlín. Potreba a časovanie ďalších živín je možné posúdiť pozorovaním kontrolných rastlín. Odporúča sa spodné dopĺňanie vody do testovacích nádob (napr. pomocou knôtov zo sklenených vlákien). Počiatočné vrchné zavlažovanie sa však môže využiť na stimuláciu klíčenia semena a v prípade aplikácie na povrchu pôdy uľahčuje pohyb chemikálie do pôdy.

24. Osobitné podmienky rastu by mali byť vhodné pre skúmaný testovací druh a testovanú chemikáliu. Kontrolné rastliny a rastliny s aplikovanou chemikáliou sa musia uchovávať v rovnakých podmienkach prostredia, mali by sa však prijať primerané opatrenia, aby sa zabránilo krížovej expozícii (napr. prchavých chemikálií) medzi jednotlivými rastlinami s aplikovanou chemikáliou a kontrolných rastlín testovacím chemikáliám.

Testovanie s jednou koncentráciou/dávkou

25. Pri určovaní vhodnej koncentrácie/dávky chemikálie na vykonanie testu s jednou koncentráciou alebo dávkou (kontrolný/limitný test) je potrebné zvážiť viaceré faktory. V prípade všeobecných chemikálií to zahŕňa fyzikálne/chemické vlastnosti danej chemikálie. V prípade výrobkov na ochranu plodín je potrebné zvážiť fyzikálne/chemické vlastnosti a spôsob použitia testovanej chemikálie, jej maximálnu koncentráciu alebo aplikačnú dávku, počet aplikácií za sezónu a/alebo perzistenciu testovanej chemikálie. Na zistenie, či všeobecná chemikália má fytotoxické vlastnosti, môže byť vhodné vykonať test pri maximálnej hladine 1 000 mg/kg suchej pôdy.

Test na vyhľadávanie rozsahu

26. V prípade potreby sa môže vykonať test na vyhľadávanie rozsahu, poskytujúci usmernenie týkajúce sa koncentrácií/dávok, ktoré sa majú testovať v rámci konečnej štúdie odozvy na dávku. Pri teste na vyhľadávanie rozsahu by hodnoty testovacích koncentrácií/dávok mali mať veľké rozstupy (napr. 0,1, 1, 10, 100 a 1 000 mg/kg suchej pôdy). V prípade výrobkov na ochranu plodín by sa hodnoty koncentrácií/dávok mohli zakladať na odporúčaných alebo maximálnych hodnotách koncentrácie alebo aplikačnej dávky, napríklad 1/100, 1/10, 1/1 odporúčanej/maximálnej koncentrácie alebo aplikačnej dávky.

Testovanie s viacerými koncentráciami/dávkami

27. Účelom testu s viacerými koncentráciami/dávkami je určiť vzťah dávky a účinku a stanoviť hodnotu EC_x alebo ER_x pre vzchádzanie, biomasu a/alebo vizuálne účinky v porovnaní s kontrolnými rastlinami bez expozície tak, ako to vyžadujú regulačné orgány.

28. Počet a rozstup hodnôt koncentrácie alebo dávky by mal byť dostatočný na vytvorenie spoľahlivého vzťahu dávky a účinku a príslušnej regresnej rovnice, ako aj na stanovenie odhadu hodnoty EC_x alebo ER_x. Zvolené koncentrácie/dávky by mali zahŕňať hodnoty EC_x alebo ER_x, ktoré treba určiť. Napríklad, ak sa požaduje hodnota koncentrácie EC_{50}, bolo by žiaduce vykonať test s dávkami, ktoré vytvárajú účinok 20 – 80 %. Na dosiahnutie tohto cieľa sa odporúča použiť najmenej päť testovacích koncentrácií/dávok v geometrickom rade, spolu s kontrolnými vzorkami bez aplikovanej chemikálie, pričom faktor rozstupu medzi hodnotami by nemal presahovať

▼M6

tri. Počet replikátov pre každú skupinu s aplikovanou chemikáliou a kontrolnú skupinu by mal byť najmenej štyri a celkový počet semien by mal byť najmenej 20. V prípade väčšieho počtu replikátov určitých rastlín s nízkou rýchlosťou klíčenia alebo variabilnými spôsobmi rastu môže byť potrebné zvýšiť štatistickú významnosť testu. Ak sa použije väčší počet testovacích koncentrácií/dávok, počet replikátov sa môže znížiť. Ak sa má odhadnúť hodnota koncentrácie NOEC, na dosiahnutie želanej štatistickej významnosti môže byť potrebných viac replikátov (23).

Pozorovania

29. Počas sledovaného obdobia, t. j. 14 až 21 dní od vyklíčenia 50 % kontrolných rastlín (prípadne aj kontrol s aplikáciou rozpúšťadla), sa rastliny často pozorujú (najmenej raz týždenne, a ak je to možné, denne), pričom sa sleduje klíčenie a vizuálna fytotoxicita a mortalita. Na konci testu by sa mali zaznamenať výsledky merania percentuálnych hodnôt vzchádzania a množstva biomasy rastlín, ktoré prežili, ako aj viditeľné škodlivé účinky na rôzne časti rastliny. Medzi viditeľné škodlivé účinky patria abnormality vo vzhľade vzídených sadeníc, zastavený rast, chloróza, úbytok farby, mortalita a účinky na vývoj rastliny. Konečné množstvo biomasy je možné merať pomocou konečnej priemernej sušiny vo výhonkoch rastlín, ktoré prežili. Výhonky na povrchu pôdy na zozbierajú a vysušia na konštantnú hmotnosť pri teplote 60 °C. Alternatívne sa konečné množstvo biomasy môže merať pomocou hmotnosti výhonkov v čerstvom stave. Ďalším konečným parametrom môže byť výška výhonku, ak to vyžadujú regulačné orgány. Na hodnotenie pozorovateľných toxických reakcií by sa mal použiť jednotný systém hodnotenia viditeľného poškodenia. Príklady kvalitatívneho a kvantitatívneho vizuálneho hodnotenia sú uvedené v literatúre pod číslami (23) (24).

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Štatistická analýza

Test s jednou koncentráciou/dávkou

30. Údaje pre každý rastlinný druh by sa mali analyzovať s použitím vhodnej štatistickej metódy (21). V správe by sa mala uviesť úroveň účinku pri testovanej koncentrácii/dávke alebo skutočnosť, že sa pri testovanej koncentrácii/dávke daný účinok nedosiahol (napr. účinok < x % pozorovaný pri koncentrácii alebo dávke y).

Test s viacerými koncentráciami/dávkami

31. Vzťah medzi dávkou a reakciou sa stanoví regresným výpočtom. Použiť sa môžu rôzne modely: napríklad na odhad hodnôt EC_x alebo ER_x (napr. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) a ich hraníc spoľahlivosti pre vzchádzanie ako kvantálny údaj by mohli byť vhodné metódy ako probitová, logitová, Weibullova, Spearman-Karberova, upravená Spearman-Karberova atď. Pre priebežné parametre rastu sadeníc (hmotnosť a výšku) sa hodnoty EC_x alebo ER_x a ich hranice spoľahlivosti môžu odhadnúť pomocou vhodnej regresnej analýzy [napríklad Bruceova-Versteegova nelineárna regresná analýza (25)]. Vždy, keď je to možné, hodnota R^2 pre najcitlivejšie druhy by mala byť 0,7 alebo vyššia a účinky použitých testovacích koncentrácií/dávok by mali byť v rozsahu 20 až 80 %. Ak sa má odhadnúť hodnota koncentrácie NOEC, uprednostniť by sa malo použitie výkonných štatistických testov a tie by sa mali vyberať na základe rozdelenia údajov (21) (26).

Protokol o skúške

32. V protokole o skúške by sa mali predložiť výsledky štúdie, ako aj podrobný opis podmienok testu, dôkladný rozbor výsledkov, analýza údajov a závery vyplývajúce z analýzy. Poskytnúť by sa malo zhrnutie vo forme tabuliek a prehľad výsledkov. Protokol musí obsahovať tieto informácie:

▼M6

Testovaná chemikália:

— identifikačné údaje chemikálie, dôležité vlastnosti testovanej chemikálie (napr. hodnota log P_{ow}, rozpustnosť vo vode, tlak pary a informácie o osude a správaní látky v životnom prostredí, ak sú k dispozícii),

— podrobné údaje o testovacom roztoku a overovaní testovaných koncentrácií tak, ako sa uvádza v bode 18.

Testované druhy:

— podrobné údaje o testovacom organizme: druh/odroda, čeľaď rastliny, vedecké a bežné názvy, čo najpodrobnejšie informácie o zdroji a histórii osiva (t. j. názov dodávateľa, percentuálna klíčivosť, trieda veľkosti semena, číslo dávky alebo šarže, rok vysemenenia alebo sezóna rastu, dátum hodnotenia klíčivosti), životaschopnosť atď.,

— počet jedno- a dvojklíčnolistových testovacích druhov,

— odôvodnenie výberu druhov,

— opis skladovania, ošetrovania a udržiavania osiva.

Podmienky testu:

— testovacie zariadenie (napr. rastová komora, fytotrón a skleník),

— opis testovacieho systému (napr. rozmery nádob, materiál nádob a množstvá pôdy),

— vlastnosti pôdy (textúra alebo typ pôdy: rozdelenie a klasifikácia častíc pôdy, fyzikálne a a chemické vlastnosti vrátane percentuálneho podielu organickej hmoty, percentuálneho podielu organického uhlíka a pH),

— príprava pôdy/substrátu (napr. pôdy, umelo pripravenej pôdy, piesku a pod.) pred testom,

— opis média obsahujúceho živiny, ak sa použilo,

— aplikácia testovanej chemikálie: opis metódy aplikácie, opis vybavenia, miera a objem expozície vrátane verifikácie chemikálie, opisu kalibračnej metódy a opisu podmienok prostredia počas aplikácie,

— podmienky rastu: svietivosť (napr. fotosynteticky aktívneho žiarenia), fotoperióda, maximálne a minimálne teploty, rozpis a metóda zavlažovania, hnojenie,

— počet semien v každej nádobe, počet rastlín na dávku, počet replikátov (paralelných nádob) na mieru expozície,

— typ a počet kontrolných vzoriek (negatívne a/alebo pozitívne kontrolné vzorky, kontrolné vzorky s rozpúšťadlom, ak sa použili),

— trvanie testu.

Výsledky:

— tabuľka všetkých parametrov pre každý replikát, testovaná koncentrácia/dávka a druh rastliny,

— počet a percento vyklíčených sadeníc a vzchádzania v porovnaní s kontrolnými vzorkami,

— meranie množstva biomasy rastlín (suchej hmotnosti výhonkov alebo hmotnosti výhonkov v čerstvom stave) ako percentuálneho podielu kontrolných rastlín,

▼**M6**

— výška výhonkov rastlín ako percentuálny podiel kontrolných rastlín, ak sa meria,

— percentuálna miera viditeľného poškodenia a kvalitatívny a kvantitatívny opis viditeľného poškodenia (chloróza, nekróza, vädnutie, deformácia listov a stonky, ako aj neprítomnosť účinkov) spôsobeného testovanou chemikáliou v porovnaní s kontrolnými rastlinami,

— opis hodnotiacej škály používanej na posúdenie viditeľného poškodenia, ak sa vizuálne hodnotenie vykonáva,

— v prípade štúdií s jednou dávkou aj percentuálna miera poškodenia,

— hodnoty EC_x alebo ER_x (napr. EC_{50}, ER_{50}, EC_{25}, ER_{25}) a súvisiace hranice spoľahlivosti; ak sa vykonáva regresná analýza, uvedie sa štandardná chyba pre regresný výpočet a štandardná chyba pre odhad jednotlivých parametrov (napr. sklon, úsek),

— hodnota koncentrácie NOEC (a LOEC), ak sa vypočítava,

— opis použitých štatistických postupov a predpokladov,

— grafické zobrazenie týchto údajov a vzťahu dávky a účinku testovacích druhov.

Uvedú sa odchýlky od postupov opísaných v tejto testovacej metóde a všetky nezvyčajné udalosti počas testu.

LITERATÚRA

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). 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. Proc. 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). 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. Chapter C.33 of this Annex: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/ Eisenia andrei*).

▼M6

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov

Účinná zložka (alebo účinná látka) je materiál určený na vyvolanie osobitného biologického účinku (napr. na reguláciu hmyzu, reguláciu chorôb rastlín, reguláciu buriny v oblasti, kde sa aplikuje testovaná chemikália), známy aj ako technická účinná zložka, účinná látka.

Chemikália je látka alebo zmes.

Výrobky na ochranu plodín alebo prípravky na ochranu rastlín alebo pesticídy sú materiály so špecifickou biologickou aktivitou, ktoré sa úmyselne používajú na ochranu plodín pred škodcami (napr. plesňovými ochoreniami, hmyzom a konkurenčnými rastlinami).

Účinná koncentrácia x % (EC_x) alebo účinná dávka x % (ER_x) je koncentrácia alebo dávka, ktorá má za následok nežiaducu zmenu alebo modifikáciu konečného parametra testu o x % pri meraní vo vzťahu ku kontrolnej vzorke (napr. redukciu vzchádzania semien, hmotnosti výhonkov, konečného počtu prítomných rastlín alebo nárast viditeľného poškodenia o 25 % alebo 50 % by predstavovalo hodnoty EC_{25}/ER_{25} alebo EC_{50}/ER_{50}).

Vzchádzanie je objavenie sa časti klíčka (koleoptily alebo kotyledónu) nad povrchom pôdy.

Prípravok je komerčne pripravený výrobok s obsahom účinnej látky (účinnej zložky), známy aj ako konečný prípravok ([1]) alebo typický výrobok na konečné použitie.

LOEC (najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom) je najnižšia koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej bol pozorovaný daný účinok. Pokiaľ ide o tento test, koncentrácia zodpovedajúca hodnote LOEC má štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) v rámci daného expozičného času v porovnaní s kontrolnou vzorkou, a je vyššia ako hodnota NOEC.

Necieľové rastliny: ide o rastliny, ktoré sa nachádzajú mimo cieľovej oblasti. V prípade výrobkov na ochranu plodín sa to zvyčajne týka rastlín mimo oblasti s aplikovanou chemikáliou.

NOEC (koncentrácia bez pozorovaného účinku) je najvyššia koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej nebol pozorovaný žiadny účinok. V tomto teste koncentrácia zodpovedajúca hodnote NOEC nemá žiadny štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) v rámci daného expozičného času v porovnaní s kontrolnou vzorkou.

Fytotoxicita je súbor negatívnych odchýlok (na základe merania a vizuálneho hodnotenia) od obvyklého vzhľadu a rastu rastlín v reakcii na danú chemikáliu.

Replikát je experimentálna jednotka, ktorá predstavuje kontrolnú skupinu a/alebo skupinu s aplikovanou chemikáliou. V rámci týchto štúdií sa za replikát považuje paralelná nádoba.

Vizuálne hodnotenie je hodnotenie viditeľného poškodenia na základe pozorovaní rastlinného porastu, vitality, malformácie, chlorózy, nekrózy a celkového vzhľadu v porovnaní s kontrolnou vzorkou.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

([1]) Konečný prípravok je komerčne predávaný pripravený výrobok obsahujúci účinnú chemikáliu (účinnú zložku).

▼**M6**

Dodatok 2

Zoznam druhov v minulosti používaných na testovanie rastlín

Čeľaď	Druh	Slovenský názov
DICOTYLEDONAE		
Apiaceae (Umbelliferae)	*Daucus carota*	mrkva obyčajná
Asteraceae (Compositae)	*Helianthus annuus*	slnečnica ročná
Asteraceae (Compositae)	*Lactuca sativa*	šalát siaty
Brassicaceae (Cruciferae)	*Sinapis alba*	horčica biela
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica campestris var. chinensis*	kapusta poľná čínska
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica napus*	kapusta repková
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica oleracea var. capitata*	kapusta obyčajná hlávková
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica rapa*	kapusta poľná
Brassicaceae (Cruciferae)	*Lepidium sativum*	žerucha siata
Brassicaceae (Cruciferae)	*Raphanus sativus*	reďkev siata
Chenopodiaceae	*Beta vulgaris*	repa obyčajná
Cucurbitaceae	*Cucumis sativus*	uhorka siata
Fabaceae (Leguminosae)	*Glycine max (G. soja)*	sója fazuľová
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus aureus*	fazuľa zlatá (mungo)
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus vulgaris*	fazuľa obyčajná fazuľa záhradná
Fabaceae (Leguminosae)	*Pisum sativum*	hrach siaty
Fabaceae (Leguminosae)	*Trigonella foenum-graecum*	senovka grécka
Fabaceae (Leguminosae)	*Lotus corniculatus*	ľadenec rožkatý
Fabaceae (Leguminosae)	*Trifolium pratense*	ďatelina lúčna
Fabaceae (Leguminosae)	*Vicia sativa*	vika siata
Linaceae	*Linum usitatissimum*	ľan siaty
Polygonaceae	*Fagopyrum esculentum*	pohánka jedlá
Solanaceae	*Solanum lycopersicon*	rajčiak jedlý

▼**M6**

Čeľaď	Druh	Slovenský názov
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amaryllada-ceae)	*Allium cepa*	cesnak cibuľový
Poaceae (Gramineae)	*Avena sativa*	ovos siaty
Poaceae (Gramineae)	*Hordeum vulgare*	jačmeň siaty
Poaceae (Gramineae)	*Lolium perenne*	mätonoh trváci
Poaceae (Gramineae)	*Oryza sativa*	ryža siata
Poaceae (Gramineae)	*Secale cereale*	raž siata
Poaceae (Gramineae)	*Sorghum bicolor*	cirok dvojfarebný
Poaceae (Gramineae)	*Triticum aestivum*	pšenica letná
Poaceae (Gramineae)	*Zea mays*	kukurica siata

▼M6

Dodatok 3

Zoznam potenciálnych nepoľnohospodárskych druhov

Potenciálne druhy na testovanie toxicity rastlín podľa OECD

Poznámka: Táto tabuľka poskytuje informácie o 52 nepoľnohospodárskych druhoch (odkazy na literatúru sú uvedené v zátvorkách pri každom zápise). Údaje o klíčivosti sú prevzaté z publikovanej literatúry a slúžia len na všeobecné usmernenie. Individuálne skúsenosti sa môžu líšiť v závislosti od zdroja osiva a iných faktorov.

ČEĽAĎ Botanický názov druhu (slovenský názov)	Životnosť (1) a biotop	Hmotnosť osiva (mg)	Fotoperióda na klíčenie alebo rast (2)	Hĺbka sadenia (mm) (3)	Čas na klíčenie (počet dní) (4)	Osobitné postupy (5)	Test toxicity (6)	Dodávatelia osív (7)	Ďalšie odkazy (8)
APIACEAE *Torilis japónica* (torica japonská)	A, B narušené oblasti, živé ploty, pastviny (16, 19)	1,7 – 1,9 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	studená stratifikácia (7, 14, 18, 19) môže byť potrebné dozrievanie (19) klíčenie brzdí tma (1, 19) žiadne osobitné postupy (5)	PO (5)		
ASTERACEAE *Bellis perennis* (sedmokráska obyčajná)	P lúky, orná pôda, rašeliny (16, 19)	0,09 – 0,17 (4, 19)	L = D (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (18, 19) žiadne osobitné postupy (4, 14)	PO (4)	A, D, F	7
Centaurea cyanus (nevädza poľná)	A polia, blízkosť ciest, otvorené biotopy (16)	4,1 – 4,9 (4, 14)	L = D (14)	0-3 (2, 4, 14)	14 – 21 (100 %) (14)	žiadne osobitné postupy (2, 4)	PO (2,4)	A, D, E, F	7
Centaurea nigra (nevädzovec frygický pravý)	P polia, blízkosť ciest, otvorené biotopy (16, 19)	2,4 – 4,9 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	môže byť potrebné dozrievanie (18, 19) klíčenie brzdí tma (19) žiadne osobitné postupy (5, 14, 26)	PO (5, 22, 26)	A	
Inula helenium (oman pravý)	P vlhké, narušené oblasti (16)	1 – 1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		žiadne osobitné postupy (4)	PO (4)	A, F	

▼M6

ČEĽAĎ Botanický názov druhu (slovenský názov)	Životnosť ([1]) a biotop	Hmotnosť osiva (mg)	Fotoperióda na klíčenie alebo rast ([2])	Hĺbka sadenia (mm) ([3])	Čas na klíčenie (počet dní) ([4])	Osobitné postupy ([5])	Test toxicity ([6])	Dodávatelia osív ([7])	Ďalšie odkazy ([8])
Leontodon hispidus (púpavec srstnatý)	P polia, blízkosť ciest, narušené oblasti (16, 19)	0,85 – 1,2 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	klíčenie brzdí tma (17, 18, 19) žiadne osobitné postupy (5, 23)	PO (5, 22, 23)		
Rudbeckia hirta (rudbekia srstnatá)	B, P narušené oblasti (16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	žiadne osobitné postupy (4, 14, 33)	PO (4, 33)	C, D, E, F	
Solidago canadensis (zlatobyľ kanadská)	P pasienky, otvorené priestranstvá (16)	0,06 – 0,08 (4, 14)	L = D (11)	0 (4)	14 – 21 (11)	zmiešať s rovnakým dielom piesku a namočiť do 500 ppm GA na 24 hodín (11) žiadne osobitné postupy (4)	PO (4)	E, F	
Xanthium pensylvanicum (voškovník)	A polia, otvorené biotopy (16)	25 – 61 (14, 29)		0(1) 5(29)		klíčenie môže brzdiť tma (1) namočiť do teplej vody na 12 hodín (29)	PRED a PO (31)	A	
Xanthium spinosum (voškovník tŕnitý)	A otvorené biotopy (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 (6)		skarifikácia (14) žiadne osobitné postupy (6)	PRED a PO (6)	A	
Xanthium strumarium (voškovník obyčajný)	A polia, otvorené biotopy (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10 – 20 (6, 21)		žiadne osobitné postupy (6, 14, 21)	PRED a PO (6, 21, 28, 31)	A	
BRASSICACEAE *Cardamine pratensis* (žerušnica lúčna)	P polia, blízkosť ciest, rašeliny (16, 19)	0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	klíčenie brzdí tma (18, 19) žiadne osobitné postupy (5, 14, 22)	PO (5, 22)	F	

▼M6

ČEĽAĎ Botanický názov druhu (slovenský názov)	Životnosť ([1]) a biotop	Hmotnosť osiva (mg)	Fotoperióda na klíčenie alebo rast ([2])	Hĺbka sadenia (mm) ([3])	Čas na klíčenie (počet dní) ([4])	Osobitné postupy ([5])	Test toxicity ([6])	Dodávatelia osív ([7])	Ďalšie odkazy ([8])
CARYOPHYLLACEAE *Lychnis flos-cuculi* (kukučka lúčna)	P (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	môže byť potrebné dozrievanie (18) žiadne osobitné postupy (5, 14, 15, 22 – 26)	PO (5, 15, 22-26)	F	
CHENOPODIACEAE *Chenopodium album* (mrlík biely)	A medze, narušené oblasti (16, 19)	0,7 – 1,5 (14, 19, 34)	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	postup sa odlišuje v závislosti od farby osiva (19) dormancia skladovaním v suchu (19) klíčenie brzdí tma (1, 18, 19) studená stratifikácia (18) žiadne osobitné postupy (14, 34)	PRED a PO (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE *Hypericum perforatum* (ľubovník bodkovaný)	P polia, orná pôda, otvorené biotopy (16, 19)	0,1 – 0,23 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	klíčenie brzdí tma (1, 18, 19) žiadne osobitné postupy (5, 14, 15, 25, 27)	PO (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE *Ipomoea hederacea* (povojník)	A blízkosť ciest, otvorené biotopy, obilné polia (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10-20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (1) žiadne osobitné postupy (6, 21)	PRED a PO (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE *Cyperus rotundus* (šachor)	P orná pôda, pasienky, blízkosť ciest (16, 30)	0,2 (14)	L = D (14)	0 (1) 10 – 20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	klíčenie brzdí tma (1) žiadne osobitné postupy (6, 10, 14)	PRED a PO (6, 28, 31)	B	7
FABACEAE *Lotus corniculatus* ľadenec rožkatý	P trávnaté plochy, blízkosť ciest, otvorené biotopy (16, 19)	1 – 1,67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	skarifikácia (14, 19) klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (18, 19) žiadne osobitné postupy (23, 25)	PO (5, 23, 25)	A, D, E, F	

▼M6

ČEĽAĎ Botanický názov druhu (slovenský názov)	Životnosť ([1]) a biotop	Hmotnosť osiva (mg)	Fotoperióda na klíčenie alebo rast ([2])	Hĺbka sadenia (mm) ([3])	Čas na klíčenie (počet dní) ([4])	Osobitné postupy ([5])	Test toxicity ([6])	Dodávatelia osív ([7])	Ďalšie odkazy ([8])
Senna obtusifolia (kasia sennová)	A vlhké lesy (16)	23-28 (9)	L = D (14) L > D (9)	10 – 20 (6,9)		namočiť semená do vody na 24 hodín (9) skarifikácia (14) životaschopnosť osiva sa odlišuje v závislosti od farby (1) žiadne osobitné postupy (6)	PO (6,9)	A	
Sesbania exaltata (konope)	A aluviálne pôdy (16)	11 – 13 (9, 14)	L > D (9)	10 – 20 (9, 21)		namočiť semená do vody na 24 hodín (9) klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (1) žiadne osobitné postupy (21, 14)	PRED a PO (9, 21, 28, 31)	A	
Trifolium pratense ďatelina lúčna	P polia, blízkosť ciest, orná pôda (16, 19)	1,4 – 1,7 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	skarifikácia (14, 18) môže byť potrebné dozrievanie (19) klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (1, 19) žiadne osobitné postupy (5)	PO (5)	A, E, F	
LAMIACEAE *Leonurus cardiaca* (srdcovník obyčajný)	P otvorené priestranstvá (16)	0,75 – 1,0 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		žiadne osobitné postupy (4, 14)	PO (4)	F	
Mentha spicata (mäta klasnatá)	P vlhké oblasti (16)	2,21 (4)		0 (4)		žiadne osobitné postupy (4)	PO (4)	F	
Nepeta cataria (kocúrnik obyčajný)	P narušené oblasti (16)	0,54 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		žiadne osobitné postupy (2, 4, 14)	PO (2,4)	F	

▼M6

ČEĽAĎ Botanický názov druhu (slovenský názov)	Životnosť ([1]) a biotop	Hmotnosť osiva (mg)	Fotoperióda na klíčenie alebo rast ([2])	Hĺbka sadenia (mm) ([3])	Čas na klíčenie (počet dní) ([4])	Osobitné postupy ([5])	Test toxicity ([6])	Dodávatelia osív ([7])	Ďalšie odkazy ([8])
Prunella vulgaris (čiernohlávok obyčajný)	P orná pôda, trávnaté plochy, narušené oblasti (16, 19)	0,58 – 1,2 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	klíčenie brzdí tma (18, 19) väčšie klíčenie pri väčších semenách (1) žiadne osobitné postupy (4, 14, 22)	PO (4, 22)	A, F	
Stachys officinalis (betonika lekárska)	P lúky, medze (19)	14 – 18 (14, 19)	L = D (14)		7 (50 %) (19)	žiadne osobitné postupy (5, 14, 22)	PO (5, 22)	F	
MALVACEAE *Abutilón theophrasti* (abutilon)	A polia, otvorené biotopy (16)	8,8 (14)	L = D (14)	10 – 20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	skarifikácia (14) žiadne osobitné postupy (5, 10, 21)	PRED a PO (6, 22, 28, 31)	A, F	
Sida spinosa (podlsnečník)	A polia, blízkosť ciest (16)	3,8 (14)	L = D (14)	10 – 20 (6, 21)		skarifikácia (14) klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (1) žiadne osobitné postupy (6, 21)	PRED a PO (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE *Papaver rhoeas* (mak vlčí)	A polia, orná pôda, narušené oblasti (16, 19)	0,1 – 0,3 (4, 14, 19, 29)	L = D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	studená stratifikácia a skarifikácia (1, 19, 32) žiadne osobitné postupy (4, 14, 29)	PO (4)	A, D, E, F, G	
POACEAE *Agrostis tenuis* (psinček tenký)	trávniky, pasienky (16)	0,07 (14)	L > D (IO)	20 (10)	10 (62 %) (10)	klíčenie brzdí tma (1, 17 – 19) žiadne osobitné postupy (10)	PO (10)	A, E	
Alopecurus myosuroides (psiarka roľná)	A polia, otvorené biotopy (16)	0,9 – 1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	skarifikácia (14) ošetriť 101 mg/l KNO3 (14) teplá stratifikácia (1) klíčenie brzdí tma (1) žiadne osobitné postupy (34)	PRED a PO (28, 34)	A	32

▼M6

ČEĽAĎ Botanický názov druhu (slovenský názov)	Životnosť ([1]) a biotop	Hmotnosť osiva (mg)	Fotoperióda na klíčenie alebo rast ([2])	Hĺbka sadenia (mm) ([3])	Čas na klíčenie (počet dní) ([4])	Osobitné postupy ([5])	Test toxicity ([6])	Dodávatelia osív ([7])	Ďalšie odkazy ([8])
Avena fatua (ovos hluchý)	A obrábané plochy, otvorené biotopy (16)	7 – 7,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10 – 20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	skarifikácia (7, 32) klíčenie brzdí tma (1) studená stratifikácia (1, 18) žiadne osobitné postupy (6, 10, 14)	PRED a PO (6, 10, 28, 31)	A	
Bromus tectorum (stoklas strechový)	A polia, blízkosť ciest, orná pôda (16)	0,45 – 2,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		obdobie dozrievania (1, 7, 32) klíčenie brzdí svetlo (1) žiadne osobitné postupy (14)	PRED a PO (28, 31)	A	
Cynosurus cristatus (hrebienka obyčajná)	P polia, blízkosť ciest, otvorené biotopy (16, 19)	0,5 – 0,7 (14, 19, 29)	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (19) žiadne osobitné postupy (14, 29)	PO (5)	A	
Digitaria sanguinalis (rosička krvavá)	A polia, rašeliny, otvorené biotopy (16)	0,52 – 0,6 (14, 30)	L = D (14)	10 – 20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	skarifikácia, studená stratifikácia a dozrievanie (1, 7, 14, 32) ošetriť 101 mg/l KNO3 (14) klíčenie brzdí tma (1) žiadne osobitné postupy (21)	PRED a PO (18, 25, 31)	A	
Echinochloa crusgalli (ježatka kuria)	A (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10 – 20 (7, 21)		skarifikácia (7, 32) klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (1) žiadne osobitné postupy (3, 14, 21)	PRED a PO (3, 21, 28, 31)	A	
Elymus canadensis (pýrovník kanadský)	P pobrežné územia, narušené oblasti (16)	4 – 5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14 – 28 (11)	žiadne osobitné postupy (2, 11)	PO (2)	C, D, E	
Festuca pratensis (kostrava lúčna)	P polia, vlhké oblasti (16, 19)	1,53 – 2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	žiadne osobitné postupy (10, 19)	PO (10)	A	7

▼M6

ČEĽAĎ Botanický názov druhu (slovenský názov)	Životnosť ([1]) a biotop	Hmotnosť osiva (mg)	Fotoperióda na klíčenie alebo rast ([2])	Hĺbka sadenia (mm) ([3])	Čas na klíčenie (počet dní) ([4])	Osobitné postupy ([5])	Test toxicity ([6])	Dodávatelia osív ([7])	Ďalšie odkazy ([8])
Hordeum pusillum (jačmeň)	A pasienky, blízkosť ciest, otvorené biotopy (16)	3,28 (14)				teplá stratifikácia (1) klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (1)	PRED (31)		7
Phieum pratense (timotejka lúčna)	P pasienky, orná pôda, narušené oblasti (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0 – 10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	klíčenie brzdí tma (19) klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (17) žiadne osobitné postupy (10, 14, 17, 19)	PO (10)	A, E	
POLYGONACEAE *Polygonum convolvulus* (pohánkovec ovíjavý)	A otvorené biotopy, blízkosť ciest (16)	5 – 8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0 – 2 (4, 29)		studená stratifikácia 4 – 8 týždňov (1, 2, 4, 20, 29) klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (1)	PRED a PO 1, 2, 20, 28, 31	A	32
Polygonum lapathifolium (horčiak štiavolistý)	A vlhká pôda (16)	1,8 – 2,5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18)	klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (1) klíčenie brzdí tma (18) studená stratifikácia (1) žiadne osobitné postupy (5)	PRED a PO (6)	A, E	
Polygonum pennsylvanicum (horčiak)	A polia, otvorené biotopy (16)	3,6 – 7 (14, 29)		2 (29)		studená stratifikácia 4 týždne pri teplote 0 – 5 °C (1, 29) klíčenie brzdí tma (1)	PRED (31)	A, E	
Polygonum periscaria (horčiak broskyňolistý)	A narušené oblasti, orná pôda (16, 19)	2,1 – 2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	skarifikácia, studená stratifikácia, ošetrenie GA (14) studená stratifikácia, dozrievanie (17 – 19) klíčenie brzdí tma (19) žiadne osobitné postupy (13)	PO (13)	A	32

▼M6

ČEĽAĎ Botanický názov druhu (slovenský názov)	Životnosť ([1]) a biotop	Hmotnosť osiva (mg)	Fotoperióda na klíčenie alebo rast ([2])	Hĺbka sadenia (mm) ([3])	Čas na klíčenie (počet dní) ([4])	Osobitné postupy ([5])	Test toxicity ([6])	Dodávatelia osív ([7])	Ďalšie odkazy ([8])
Rumex crispus (štiavec kučeravý)	P orná pôda, blízkosť ciest, otvorené priestranstvá (16, 19)	1,3 – 1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	klíčenie brzdí tma (18, 19) môže byť potrebné dozrievanie (18) žiadne osobitné postupy (4, 14, 33)	PO (4, 33)	A, E	32
PRIMULACEAE *Anagallis arvensis* (drchnička roľná)	A orná pôda, otvorené priestranstvá, narušené oblasti (16, 19)	0,4 – 0,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	studená stratifikácia, ošetrenie GA (1,14, 18, 19, 32) na klíčenie je potrebné svetlo (1) žiadne osobitné postupy (2, 4)	PO (2,4)	A, F	
RANUNCULACEAE *Ranunculus acris* (iskerník prudký)	P orná pôda, blízkosť ciest, otvorené priestranstvá (16, 19)	1,5 – 2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41 – 56 (19, 29)	žiadne osobitné postupy (5, 14, 22, 24 – 26)	PO (5, 22, 24 – 26)		32
ROSACEAE *Geum urbanum* (kuklík mestský)	P živé ploty, vlhké oblasti (16, 19)	0,8 – 1,5 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	klíčenie brzdí tma (18, 19) teplá stratifikácia (1) žiadne osobitné postupy (5, 14, 22, 25, 26)	PO (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE *Galium aparine* (lipkavec obyčajný)	A orná pôda, vlhké oblasti, narušené oblasti (16, 19)	7 – 9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	studená stratifikácia (1, 18, 19) klíčenie neovplyvňuje intenzita ožiarenia (18, 19) klíčenie brzdí svetlo (1) žiadne osobitné postupy (6, 14)	PRED a PO (6, 28)	A	32

▼M6

ČEĽAĎ Botanický názov druhu (slovenský názov)	Životnosť ([1]) a biotop	Hmotnosť osiva (mg)	Fotoperióda na klíčenie alebo rast ([2])	Hĺbka sadenia (mm) ([3])	Čas na klíčenie (počet dní) ([4])	Osobitné postupy ([5])	Test toxicity ([6])	Dodávatelia osív ([7])	Ďalšie odkazy ([8])
Galium mollugo (lipkavec mäkký)	P okraje živých plotov, otvorené priestranstvá (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		žiadne osobitné postupy (5, 14, 22, 24, 26, 29)	PO (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE *Digitalis purpurea* (náprstník červený)	B, P živé ploty, otvorené priestranstvá (16, 19)	0,1 – 0,6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	klíčenie brzdí tma (1, 17 – 19) žiadne osobitné postupy (4, 22 – 26)	PO (4, 22 – 26)	D, G, F	
Veronica persica (veronika perzská)	A orná pôda, otvorené priestranstvá, narušené oblasti (16, 19)	0,5 – 0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (19) 5 (96 %) (18)	klíčenie brzdí tma (18, 19) studená stratifikácia (18) žiadne osobitné postupy (14)	PRED a PO (28)	A	32

([1]) A = jednoročné rastliny, B = dvojročné rastliny, P = trvalky.
([2]) Odkazy 11, 14 a 33 sa týkajú pomeru svetla (L) a tmy (D) potrebného na vyvolanie klíčenia osiva. Odkazy 3, 6, 9, 10, 13, 20 sa týkajú podmienok pestovania v skleníkoch.
([3]) Hodnota 0 mm označuje, že semená boli zasadené na povrchu pôdy alebo že semená potrebujú na klíčenie svetlo.
([4]) Uvedené čísla predstavujú počet dní, v priebehu ktorých vyklíči dané percento semien podľa literatúry, napríklad tri dni, (50 %) vyklíčených semien, odkaz na literatúru (19).
([5]) Trvanie dozrievania a/alebo stratifikácie nie je vždy k dispozícii. Okrem požiadaviek na studené ošetrenie, teplotné podmienky nie sú uvedené, keďže v rámci skleníkových testov je regulácia teploty obmedzená. Väčšina semien bude klíčiť za bežného kolísania teploty v skleníkoch.
([6]) Označuje druhy rastlín, ktoré sa pred vyklíčením (PRED) a/alebo po vyklíčení (PO) používajú v rámci testu toxicity, zahŕňajúceho herbicídy.
([7]) Poskytuje príklad/príklady obchodných dodávateľov osiva.
([8]) Uvádza dva alternatívne odkazy na literatúru, ktorá sa použila.

▼**M6**

Uvádzaní dodávatelia semien

Označenie dodávateľa	Informácie o dodávateľovi
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

UVÁDZANÁ LITERATÚRA

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**

Dodatok 4

Príklady vhodných rastových podmienok pre určité druhy plodín

Tieto podmienky sa považujú za vhodné pre desať druhov plodín a môžu sa použiť aj ako usmernenie pre testy v rastových komorách s určitými inými druhmi plodín:

koncentrácia oxidu uhličitého: 350 ppm ± 50 ppm,

relatívna vlhkosť: 70 % ± 5 % počas obdobia svetla a 90 % ± 5 % počas obdobia tmy,

teplota: 25 ± 3 °C počas dňa, 20 ± 3 °C počas noci,

fotoperióda: 16 hodín svetla/8 hodín tmy, za predpokladu priemernej vlnovej dĺžky v rozsahu 400 – 700 nm,

svetlo: svietivosť 350 ± 50 µE/m^2/s, meraná vo vrchnej časti veka.

Druhy plodín:

— rajčiak jedlý (*Solanum lycopersicon*),

— uhorka siata (*Cucumis sativus*),

— šalát hlávkový (*Lactuca sativa*),

— sója fazuľová (*Glycine max*),

— kapusta obyčajná hlávková (*Brassica oleracea var. capitata*),

— mrkva obyčajná (*Daucus carota*),

— ovos siaty (*Avena sativa*),

— mätonoh trváci (*Lolium perenne*),

— kukurica siata (*Zea mays*),

— cesnak cibuľový (*Allium cepa*).

▼M6

C.32. REPRODUKČNÝ TEST S ČERVAMI ČEĽADE *ENCHYTRAEIDAE*

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 220 (2004). Je určená na posúdenie účinkov chemikálií na reprodukčný výstup červov čeľade *Enchytraeidae* (*Enchytraeus albidus* Henle 1873) v pôde. Založená je predovšetkým na metóde, ktorú vyvinula Spolková agentúra pre životné prostredie (Umweltbundesamt) v Nemecku (1) a ktorá bola podrobená kruhovým testom (2). Do úvahy sa brali aj iné metódy testovania toxicity chemikálií pre červy čeľade *Enchytraeidae* a pre dážďovky (3) (4) (5) (6) (7) (8).

ÚVODNÉ ÚVAHY

2. Pôdne červy rodu *Enchytraeus* sú ekologicky vhodné druhy na ekotoxikologické testovanie. Aj keď červy čeľade *Enchytraeidae* sa často nachádzajú v pôdach obsahujúcich dážďovky, je tiež pravda, že často sú na ne bohaté aj mnohé pôdy, v ktorých sa dážďovky nevyskytujú. Červy čeľade *Enchytraeidae* je možné použiť pri laboratórnych testoch, ako aj v rámci polopoľných a poľných štúdií. Z praktického hľadiska sú mnohé druhy rodu *Enchytraeus* vhodné vzhľadom na jednoduchú manipuláciu a rozmnožovanie a na generačný čas, ktorý je omnoho kratší ako v prípade dážďoviek. Reprodukčný test s červami *Enchytraeidae* preto trvá iba štyri až šesť týždňov, zatiaľ čo s dážďovkami (*Eisenia fetida*) je to osem týždňov.

3. Základné informácie o ekológii a ekotoxikológii čeľade *Enchytraeidae* v suchozemskom životnom prostredí je možné nájsť v literatúre pod číslami (9), (10), (11), (12).

PRINCÍP TESTU

4. Dospelé červy *Enchytraeidae* sa vystavia účinkom rôznych koncentrácií testovanej chemikálie zamiešanej do umelo pripravenej pôdy. Test je možné rozdeliť na dve fázy: a) test na vyhľadávanie rozsahu v prípade, ak nie sú k dispozícii dostatočné informácie, v rámci ktorého je hlavným parametrom mortalita hodnotená po dvoch týždňoch expozície a b) konečný reprodukčný test, v rámci ktorého sa hodnotí celkový počet juvenilných jedincov vyprodukovaných rodičovským živočíchom a prežitie rodičovských živočíchov. Konečný test trvá šesť týždňov. Po prvých troch týždňoch sa dospelé červy odoberú a zaznamenajú sa morfologické zmeny. Po ďalších troch týždňoch sa spočíta potomstvo vyliahnuté z kokónov, ktoré vyprodukovali dospelé červy. Výstup reprodukcie živočíchov exponovaných testovanej chemikálii sa porovnáva s reprodukčným výstupom kontrolných vzoriek s cieľom stanoviť hodnoty i) koncentrácie bez pozorovaného účinku (NOEC) a/alebo ii) koncentrácie EC_x (napr. EC_{10}, EC_{50}) pomocou regresného modelu na odhad koncentrácie, ktorá by spôsobila zníženie reprodukčného výstupu o x %. Koncentrácia EC_x (napr. EC_{10}, EC_{50}) by mala byť v rozsahu testovacích koncentrácií, aby sa potom hodnota EC_x určila interpoláciou namiesto extrapolácie.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

5. Predovšetkým by mala byť známa rozpustnosť vo vode, hodnota log K_{ow}, rozdeľovacia konštanta pôdnej vody (napr. kapitola C.18 alebo C.19 tejto prílohy) a tlak pary testovanej chemikálie. Žiaduce sú aj doplnkové informácie o osude testovanej chemikálie v pôde, napríklad rýchlosť fotolýzy a hydrolýzy.

6. Táto testovacia metóda sa môže použiť na chemikálie rozpustné alebo nerozpustné vo vode. Spôsob aplikácie testovanej chemikálie sa však bude zodpovedajúcim spôsobom líšiť. Testovacia metóda nie je použiteľná v prípade prchavých chemikálií, t. j. chemikálií, pre ktoré je hodnota Henryho konštanty alebo rozdeľovacej konštanty vzduch/voda vyššia ako jeden, alebo chemikálií, pre ktoré tlak pár pri teplote 25 °C presahuje hodnotu 0,0133 Pa.

▼M6

PLATNOSŤ TESTU

7. Na to, aby bol test platný, by kontrolné vzorky mali spĺňať tieto kritériá:

— mortalita dospelých jedincov by nemala presahovať hodnotu 20 % na konci testu na vyhľadávanie rozsahu a po prvých troch týždňoch reprodukčného testu,

— za predpokladu, že na začiatku testu bolo použitých 10 dospelých jedincov na nádobu, na konci testu by malo byť vyprodukovaných v priemere najmenej 25 juvenilných jedincov na nádobu,

— variačný koeficient okolo stredného počtu juvenilných jedincov na konci reprodukčného testu by nemal byť vyšší ako 50 %.

Ak test nespĺňa uvedené kritériá platnosti, jeho vykonávanie by sa malo ukončiť, pokiaľ nie je možné predložiť odôvodnenie pokračovania testu. Toto odôvodnenie by malo byť zahrnuté do správy o teste.

REFERENČNÁ CHEMIKÁLIA

8. Referenčná chemikália by sa mala testovať v pravidelných intervaloch alebo prípadne zahrnúť do každého testu s cieľom overiť, že reakcia testovaných organizmov sa postupom času výrazne nezmenila. Vhodnou referenčnou chemikáliou je karbendazim, pri ktorom sa preukázalo, že ovplyvňuje prežívanie a reprodukciu červov čeľade Enchytraeidae (13) (14), alebo by sa mohli používať aj iné chemikálie, ktorých údaje o toxicite sú dobre známe. V kruhovom teste (2) sa použil karbendazim vo forme prípravku známeho pod obchodným názvom Derosal™, ktorý dodáva spoločnosť AgrEvo (Frankfurt, Nemecko) a ktorý obsahuje 360 g/l (32,18 %) účinnej zložky. Koncentrácia EC_{50} pre reprodukciu stanovená v rámci kruhového testu dosahovala hodnoty v rozsahu 1,2 mg ± 0,8 mg účinnej zložky/kg suchej hmotnosti (2). Ak sa do série testov zahrnie pozitívny štandard toxicity, použije sa jedna koncentrácia a počet replikátov by mal byť rovnaký ako pri kontrolných vzorkách. V prípade karbendazimu sa na testovanie odporúča 1,2 mg účinnej zložky/kg suchej hmotnosti (testuje sa ako kvapalný prípravok).

OPIS TESTU

Zariadenia

9. Testovacie nádoby by mali byť vyrobené zo skla alebo iného chemicky inertného materiálu. Vhodné sú sklené poháre (napr. s objemom 0,2 – 0,25 litra a priemerom ≈ 6 cm). Nádoby by mali mať priesvitné veká (napr. zo skla alebo polyetylénu) navrhnuté tak, aby znížili vyparovanie vody, ale zároveň umožnili výmenu plynov medzi pôdou a atmosférou. Veká by mala byť priesvitné, aby umožňovali prechod svetla.

10. Potrebné je bežné laboratórne vybavenie, konkrétne toto:

— skrinka na sušenie,

— stereomikroskop,

— pH-meter a fotometer,

— vhodné presné váhy,

— primerané zariadenie na regulovanie teploty,

— primerané zariadenie na regulovanie vlhkosti (nie je to nevyhnutné, ak nádoby s exponovanými vzorkami majú veká),

— inkubátor alebo malá miestnosť s klimatizačným zariadením,

— pinzety, háčiky alebo slučky,

— fotografická miska.

Príprava umelej pôdy

11. V tomto teste sa používa umelo prirpavená pôda (5) (7) s týmto zložením (na základe sušiny vysušenej na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C):

▼M6

— 10 % rašeliny, vysušenej vzduchom a jemne drvenej (prijateľné sú častice veľkosti 2 mm ± 1 mm); odporúča sa pred použitím na test skontrolovať, či je pôda pripravená s čerstvou dávkou rašeliny vhodná na kultiváciu červov,

— 20 % kaolínovej hliny (obsah kaolinitu podľa možnosti nad 30 %),

— približne 0,3 – 1 % uhličitanu vápenatého ($CaCO_3$, práškový, analytickej čistoty) na dosiahnutie hodnoty pH 6,0 ± 0,5; pridávané množstvo uhličitanu vápenatého môže do značnej miery závisieť od kvality/vlastností rašeliny,

— približne 70 % vzduchom vysušeného kremenného piesku (v závislosti od potrebného množstva $CaCO_3$), prevažne jemný piesok s viac ako 50 % častíc s veľkosťou od 50 do 200 mikrónov.

Odporúča sa pred použitím na konečný test preukázať vhodnosť umelej pôdy na kultiváciu červov a na splnenie kritérií platnosti testu. Osobitne sa odporúča, aby sa takouto kontrolou zabezpečilo, že priebeh testu nebude ohrozený, ak obsah organického uhlíka v umelej pôde klesne, napríklad znížením obsahu rašeliny na 4 – 5 % a zodpovedajúcim zvýšením obsahu piesku. V dôsledku takéhoto poklesu obsahu organického uhlíka sa môžu znížiť možnosti adsorpcie testovanej chemikálie na pôdu (organický uhlík) a dostupnosť testovanej chemikálie pre červy sa môže zvýšiť. Preukázalo sa, že červy druhu *Enchytraeus albidus* môžu splniť kritériá platnosti, pokiaľ ide o reprodukciu, keď sa testy vykonávajú v poľných pôdach s nižším obsahom organického uhlíka, než bolo uvedené (napr. 2,7 %) (15), a existujú skúsenosti, hoci obmedzené, že toto je možné dosiahnuť aj v umelo pripravenej pôde s 5 % rašeliny.

Poznámka: Vhodnosť pôdy a splnenie kritérií platnosti testu by sa mali preukázať aj v prípade použitia prírodnej pôdy v ďalšom testovaní (napr. vyššieho stupňa).

12. Suché zložky pôdy sa dôkladne zmiešajú (napr. vo veľkokapacitnom laboratórnom miešači). Malo by sa tak urobiť prinajmenšom týždeň pred začiatkom testu. Zmiešaná pôda by sa mala skladovať dva dni, aby sa vyvážila/stabilizovala jej kyslosť. Na stanovenie pH sa používa zmes pôdy a roztoku 1 M chloridu draselného (KCl) alebo 0,01 M chloridu vápenatého ($CaCl_2$) v pomere 1: 5 (pozri literatúru (16) a dodatok 3). Ak je pôda kyslejšia než požadovaný rozsah (pozri bod 11), môže sa upraviť pridaním príslušného množstva $CaCO_3$. Ak je pôda príliš alkalická, môže sa upraviť pridaním väčšieho množstva zmesi, uvedenej v bode 11, ale s vylúčením $CaCO_3$.

13. Maximálna kapacita zadržiavania vody umelej pôdy sa stanoví v súlade s postupmi opísanými v dodatku 2. Jeden alebo dva dni pred začiatkom testu sa suchá umelá pôda predvlhčí pridaním dostatočného množstva deionizovanej vody, aby sa dosiahla približne polovica konečného obsahu vody, čo je 40 – 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody. Na začiatku testu sa predvlhčená pôda rozdelí na časti zodpovedajúce počtu testovacích koncentrácií (a v prípade potreby počtu vzoriek referenčnej chemikálie) a kontrolných vzoriek používaných na test. Obsah vlhkosti sa upraví na

▼M6

40 – 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody pridaním roztoku testovanej chemikálie a/alebo pridaním destilovanej alebo deionizovanej vody (pozri body 19 – 21). Obsah vlhkosti sa stanoví na začiatku a na konci testu (vysušením na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C) a jeho hodnota by mala byť v optimálnom rozsahu pre prežitie červov. Hrubú kontrolu obsahu vlhkosti v pôde je možné vykonať jemným stláčaním pôdy v ruke. Ak je obsah vlhkosti správny, medzi prstami by sa mali objaviť malé kvapky vody.

Výber a príprava testovacích živočíchov

14. Odporúčaný testovací druh je *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (mrlica biela), patriaci do čeľade *Enchytraeidae* (trieda *Oligochaeta*, kmeň *Annelida*). *E. albidus* je jeden z najväčších druhov čeľade *Enchytraeidae*, so zaznamenanými exemplármi dĺžky až 35 mm (17) (18). *E. albidus* sa vyskytuje na celom svete v morských, sladkovodných a suchozemských biotopoch, najmä v rozkladajúcej sa organickej hmote (morské riasy, kompost) a iba zriedka na lúkach (9). Jeho široká ekologická tolerancia a niektoré morfologické odchýlky by mohli poukazovať na existenciu viacerých línií.

15. *E. albidus* je komerčne dostupný ako krmivo pre ryby. Je potrebné skontrolovať, či kultúra nie je kontaminovaná inými, zvyčajne menšími druhmi (1) (19). Ak sa zistí kontaminácia, všetky červy by sa mali premyť vodou v Petriho miske. Potom by sa mali vybrať (pomocou stereomikroskopu) veľké dospelé exemplár*e E. albidus* s cieľom začať novú kultúru, pričom všetky ostatné červy sa odstránia. *E. albidus* je možné jednoducho pestovať v širokej škále organických materiálov (pozri dodatok 4). Životný cyklus *E. albidus* je krátky, keďže dospievanie červa trvá od 33 dní (pri teplote 18 °C) do 74 dní (pri teplote 12 °C) (1). Na test sa použijú iba kultúry, ktoré sa bez problémov udržiavali v laboratóriu najmenej päť týždňov (jedna generácia).

16. Iné druhy rodu *Enchytraeus* sú tiež vhodné, napríklad *E. buchholzi* Vejdovsky 1879 alebo *E. crypticus* Westheide a Graefe 1992 (pozri dodatok 5). Ak sa použijú iné druhy rodu *Enchytraeus*, musia byť jednoznačne identifikované a do správy by sa malo uviesť odôvodnenie výberu daného druhu.

17. Živočíchy použité na testy sú dospelé červy. Mali by mať vajíčka (biele škvrny) v oblasti klitella a mali by byť približne rovnakej veľkosti (asi 1 cm dlhé). Synchronizácia chovu kultúry nie je potrebná.

18. Ak sa červy nechovajú v tom istom druhu pôdy a za podmienok (vrátane kŕmenia) používaných pre záverečný test, musia sa aklimatizovať najmenej 24 hodín, prípadne až tri dni. Spočiatku by sa mal aklimatizovať väčší počet dospelých jedincov, než je potrebný na vykonanie testu, aby bol priestor na zamietnutie poškodených alebo inak nevhodných exemplárov. Na konci obdobia aklimatizácie sa na testy vyberú len červy, ktoré obsahujú vajíčka a nevykazujú žiadne poruchy správania (napr. pokusy uniknúť z pôdy). Červy sa opatrne vyberú pomocou klenotníckych pinziet, háčikov alebo slučiek a umiestnia sa do Petriho misky obsahujúcej malé množstvo sladkej vody. Na tento účel sa uprednostňuje rekonštituovaná sladká voda, ako sa navrhuje v kapitole C.20 tejto prílohy (reprodukčný test na *Daphnia magna*), keďže deionizovaná voda, demineralizovaná voda alebo voda z vodovodu by mohla byť pre červov škodlivá. Červy sa kontrolujú pod stereomikroskopom a každý, ktorý neobsahuje vajíčka, sa vyradí. Dbá sa na vybratie a odstránenie všetkých roztočov alebo chvostoskokov, ktoré môžu infikovať kultúry. Zdravé červy, ktoré sa nepoužijú na test, sa vrátia do zásobnej kultúry.

▼M6

Príprava testovacích koncentrácií

Testovaná chemikália rozpustná vo vode

19. Roztok testovanej chemikálie sa pripravuje s deionizovanou vodou v množstve dostatočnom pre všetky replikáty jednej testovacej koncentrácie. Odporúča sa použitie primeraného množstva vody, aby sa dosiahol požadovaný obsah vlhkosti, t. j. 40 – 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody (pozri bod 13). Každý roztok testovanej chemikálie sa pred vložením do testovacej nádoby dôkladne premieša s jednou šaržou predvlhčenej pôdy.

Testovaná chemikália nerozpustná vo vode

20. V prípade chemikálií nerozpustných vo vode, ale rozpustných v organických rozpúšťadlách, sa testovaná chemikália môže rozpustiť v čo najmenšom objeme vhodného nosiča (napr. acetónu). Používať by sa mali iba prchavé rozpúšťadlá. Nosič sa nastrieka na malé množstvo, napríklad 2,5 g, jemného kremenného piesku, alebo sa s ním zmieša. Nosič sa odstráni najmenej hodinovým odparovaním pod digestorom. Táto zmes kremenného piesku a testovanej chemikálie sa pridá do predvlhčenej pôdy a po pridaní primeraného množstva deionizovanej vody, aby sa dosiahol požadovaný obsah vlhkosti, sa dôkladne premieša. Konečná zmes sa vloží do testovacích nádob.

21. V prípade chemikálií, ktoré sú slabo rozpustné vo vode a v organických rozpúšťadlách, sa ekvivalent 2,5 g jemne drveného kremenného piesku na testovaciu nádobu zmieša s príslušným množstvom testovanej chemikálie na dosiahnutie požadovanej testovacej koncentrácie. Táto zmes kremenného piesku a testovanej chemikálie sa pridá do predvlhčenej pôdy a dôkladne zmieša s primeraným množstvom deionizovanej vody, aby sa dosiahol požadovaný obsah vlhkosti. Konečná zmes sa rozdelí medzi testovacie nádoby. Tento postup sa opakuje pre každú testovaciu koncentráciu a pripravia sa aj primerané kontrolné vzorky.

22. Chemikálie by sa spravidla nemali testovať pri koncentráciách vyšších ako 1 000 mg/kg suchej hmotnosti pôdy. Testovanie pri vyšších koncentráciách sa však môže vyžadovať v súlade s cieľmi osobitného testu.

VYKONANIE TESTOV

Testovacie skupiny a kontrolné vzorky

23. Pre každú testovaciu koncentráciu sa množstvo testovacej pôdy zodpovedajúce 20 g sušiny umiestni do testovacej nádoby (pozri body 19 – 21). Pripravia sa tiež kontrolné vzorky bez testovanej chemikálie. Do každej nádoby sa pridá potrava v súlade s postupmi opísanými v bode 29. Do každej testovacej nádoby sa náhodným výberom umiestni desať červov. Červy sa opatrne prenesú do každej testovacej nádoby a umiestnia na povrch pôdy, napríklad pomocou klenotníckych pinziet, háčikov alebo slučiek. Počet replikátov pre testovacie koncentrácie a kontrolné vzorky závisí od použitej koncepcie testu (pozri bod 34). Testovacie nádoby sa náhodne umiestnia v testovacom inkubátore a tieto pozície sa raz týždenne náhodne zmenia.

24. Ak sa na aplikáciu testovanej chemikálie použije nosič, mala by sa okrem testovacej série pripraviť jedna kontrolná séria obsahujúca kremenný piesok s nastriekaným alebo zamiešaným rozpúšťadlom. Koncentrácia rozpúšťadla alebo dispergantu by mala byť rovnaká, aká sa používa v testovacích nádobách obsahujúcich testovanú chemikáliu. V prípade chemikálií, ktoré si vyžadujú aplikáciu v súlade s postupmi uvedenými v bode 21, by sa mala pripraviť kontrolná séria obsahujúca doplnkový kremenný piesok (2,5 g na nádobu).

▼M6

Podmienky testu

25. Testovacia teplota je 20 °C ± 2 °C. S cieľom zabrániť úniku červov z pôdy sa test vykonáva v kontrolovaných cykloch svetla a tmy (podľa možnosti 16 hodín svetla a 8 hodín tmy) s intenzitou osvetlenia 400 až 800 luxov v okolí testovacích nádob.

26. S cieľom kontrolovať vlhkosť pôdy sa nádoby odvážia na začiatku testu a potom raz týždenne. Úbytok hmotnosti sa dopĺňa pridaním primeraného množstva deionizovanej vody. Je potrebné si uvedomiť, že strata vody sa môže znížiť udržiavaním vysokej vlhkosti vzduchu (> 80 %) v testovacom inkubátore.

27. Obsah vlhkosti a hodnota pH by sa mali merať na začiatku a na konci testu na vyhľadávanie rozsahu aj konečného testu. Merania by sa mali robiť v kontrolných vzorkách pôdy, ako aj vo vzorkách s aplikovanou chemikáliou (všetky koncentrácie), ktoré boli pripravené a udržiavané rovnakým spôsobom ako testovacie kultúry, ale bez červov. Potrava by sa mala pridávať do vzoriek pôdy len na začiatku testu na uľahčenie mikrobiálnej aktivity. Množstvo pridanej potravy by malo byť rovnaké, aké sa pridáva do testovaných kultúr. Počas testu nie je potrebné pridávať do týchto nádob ďalšiu potravu.

Kŕmenie

28. Používať sa môže potrava, ktorá je schopná udržiavať populáciu červov čeľade *Enchytraeidae*. Zistilo sa, že vhodným kŕmnym materiálom sú ovsené otruby, ktoré sa podľa možnosti pred použitím autoklávujú, aby sa predišlo mikrobiálnej kontaminácii (vhodné je aj zohrievanie).

29. Potrava sa najskôr pripraví zmiešaním 50 mg mletých ovsených otrúb s pôdou v každej nádobe pred vložením červov. Potom sa potrava dodáva týždenne, až do 21. dňa. Kŕmenie sa nevykoná v 28. deň, keďže dospelé jedince boli v tejto fáze premiestnené a mladé červy odvtedy potrebujú pomerne málo doplnkovej potravy. Kŕmenie počas testu pozostáva z 25 mg mletých ovsených otrúb na nádobu, ktoré sa opatrne uložia na povrch pôdy tak, aby sa predišlo poraneniu červov. V záujme obmedzenia tvorby plesní by sa uložené ovsené vločky mali prekryť malým množstvom pôdy. Ak potrava zostáva neskonzumovaná, dávka by sa mala znížiť.

Koncepcia testu na vyhľadávanie rozsahu

30. V prípade potreby sa vykoná test na vyhľadávanie rozsahu, napríklad s piatimi koncentráciami testovanej chemikálie: 0,1, 1,0, 10, 100 a 1 000 mg/kg (suchej hmotnosti pôdy). Postačuje jeden replikát pre každú vzorku s aplikovanou chemikáliou a kontrolnú vzorku.

31. Test na vyhľadávanie rozsahu trvá dva týždne. Na konci testu sa posudzuje mortalita červov. Červ sa považuje za mŕtveho, keď nereaguje na mechanický podnet v prednej časti tela. Doplnkové informácie o mortalite môžu byť užitočné aj pri rozhodovaní o rozsahu koncentrácií, ktoré sa použijú v konečnom teste. Preto by sa mali zaznamenať aj zmeny v správaní (napr. neschopnosť zavŕtať sa do pôdy, ležanie bez pohybu pri sklenej stene testovacej nádoby) a morfológii (napr. prítomnosť otvorených rán) dospelých jedincov, ako aj existencia každého juvenilného jedinca. Prírastok juvenilných jedincov je možné určovať pomocou metódy farebného označovania opísanej v dodatku 6.

32. Hodnotu koncentrácie LC_{50} je možné približne určiť výpočtom geometrickej strednej hodnoty údajov o mortalite. Pri stanovení koncentračného rozsahu pre konečný test sa predpokladá, že účinky na reprodukciu sú nižšie ako

▼M6

hodnota LC_{50}, s faktorom až do 10. To je však empirický vzťah a v každom konkrétnom prípade môže byť iný. Ďalšie pozorovania v rámci testu na vyhľadávanie rozsahu, ako je výskyt juvenilných jedincov, môžu pomôcť spresniť rozsah koncentrácie testovanej chemikálie, ktorý sa použije pri konečnom teste.

33. Na presné stanovenie hodnoty LC_{50} sa odporúča vykonanie testu s použitím najmenej štyroch replikátov každej koncentrácie testovanej chemikálie a primeraným počtom koncentrácií, ktoré vyvolajú aspoň štyri odlišné štatisticky významné stredné reakcie na tieto koncentrácie. V prípade potreby sa používa podobný počet koncentrácií a replikátov pre kontrolné vzorky.

Koncepcia konečného reprodukčného testu

34. Na základe odporúčaní vyplývajúcich z kruhového testu sa navrhujú tri koncepcie (2):

— Na stanovenie hodnoty NOEC by sa malo testovať aspoň päť koncentrácií v geometrickej sérii. Odporúčajú sa štyri replikáty pre každú testovaciu koncentráciu a osem kontrolných vzoriek. Faktor rozstupu medzi hodnotami koncentrácie by nemal presahovať 1,8.

— Na stanovenie hodnoty EC_x (napr. EC_{10}, EC_{50}) by sa malo testovať aspoň päť koncentrácií, pričom hodnota EC_x by mala byť v rozsahu týchto koncentrácií, aby sa mohla určiť interpoláciou namiesto extrapolácie. Odporúčajú sa najmenej štyri replikáty pre každú testovaciu koncentráciu a štyri kontrolné replikáty. Faktor rozstupu sa môže meniť, t. j. môže mať hodnotu najviac 1,8 v očakávanom rozsahu účinkov a viac ako 1,8 pri vyšších a nižších koncentráciách.

— Kombinovaný prístup umožňuje určenie obidvoch koncentrácií, NOEC aj EC_x. Použiť by sa malo osem koncentrácií aplikovanej chemikálie v geometrickom rade. Odporúčajú sa štyri replikáty pre každú aplikáciu chemikálie a osem kontrolných vzoriek. Faktor rozstupu medzi hodnotami koncentrácie by nemal presahovať 1,8.

35. Použiť by sa malo desať dospelých červov na testovaciu nádobu (pozri bod 23). Potrava sa pridáva do testovacích nádob na začiatku testu a potom raz týždenne (pozri bod 29), až do 21. dňa vrátane. V 21. deň sa vzorky pôdy pozorne ručne prehľadajú, nájdu a spočítajú sa žijúce dospelé červy a zaznamenajú sa zmeny v ich správaní (napr. neschopnosť zavŕtať sa do pôdy, ležanie bez pohybu pri sklenej stene testovacej nádoby) a morfológii (napr. otvorené rany). Všetky dospelé červy sa potom vyberú z testovacích nádob a testovacej pôdy. Testovacia pôda, ktorá obsahuje akékoľvek vzniknuté kokóny, sa inkubuje ďalšie tri týždne za tých istých podmienok testu, s výnimkou toho, že kŕmenie sa vykonáva len v 35. deň (25 mg mletých ovsených vločiek na nádobu).

36. Po šiestich týždňoch sa počítajú čerstvo vyliahnuté červy. Odporúča sa metóda založená na farebnom označovaní bengálskym červeným farbivom (pozri dodatok 6), hoci aj iné mokré (ale nie tepelné) techniky extrakcie a vyplavovania (pozri dodatok 6) sa ukázali ako vhodné (4) (10) (11) (20). Farebné označovanie bengálskou červeňou sa odporúča, lebo mokrej extrakcii z pôdneho substrátu môže brániť turbidite spôsobenej suspendovanými časticami ílu.

Limitný test

37. Ak sa v rámci testu na vyhľadávanie rozsahu nepozorujú žiadne účinky ani pri najvyššej koncentrácii (t. j. 1 000 mg/kg), reprodukčný test sa môže vykonať ako limitný test s použitím koncentrácie 1 000 mg/kg s cieľom dokázať, že hodnota NOEC z hľadiska reprodukcie je vyššia ako uvedená hodnota.

▼M6

Zhrnutie a harmonogram testu

38. Jednotlivé kroky testu je možné zhrnúť takto:

Čas	Test na vyhľadávanie rozsahu	Konečný test
–7. deň alebo skôr	— príprava umelej pôdy (miešanie suchých zložiek)	— príprava umelej pôdy (miešanie suchých zložiek)
–5. deň	— kontrola pH umelej pôdy — meranie maximálnej kapacity zadržiavania vody v pôde	— kontrola pH umelej pôdy — meranie maximálnej kapacity zadržiavania vody v pôde
–5. deň až –3. deň	— roztriedenie červov na aklimatizáciu	— roztriedenie červov na aklimatizáciu
– 3. až 0. deň	— aklimatizácia červov najmenej 24 hodín	— aklimatizácia červov najmenej 24 hodín
–1. deň	— predvlhčenie umelo pripravenej pôdy a rozdelenie do dávok	— predvlhčenie umelo pripravenej pôdy a rozdelenie do dávok
0. deň	— príprava zásobných roztokov — aplikácia testovanej chemikálie — váženie testovacieho substrátu do testovacích nádob — zamiešanie potravy — vloženie červov — meranie pH pôdy a obsahu vlhkosti v pôde	— príprava zásobných roztokov — aplikácia testovanej chemikálie — váženie testovacieho substrátu do testovacích nádob — zamiešanie potravy — vloženie červov — meranie pH pôdy a obsahu vlhkosti v pôde
7. deň	— kontrola vlhkosti pôdy	— kontrola vlhkosti pôdy — kŕmenie
14. deň	— stanovenie mortality dospelých jedincov — odhad počtu juvenilných jedincov — meranie pH pôdy a obsahu vlhkosti v pôde	— kontrola vlhkosti pôdy — kŕmenie
21. deň		— pozorovanie správania dospelých jedincov — premiestnenie dospelých jedincov — stanovenie mortality dospelých jedincov — kontrola vlhkosti pôdy — kŕmenie
28. deň		— kontrola vlhkosti pôdy — bez kŕmenia
35. deň		— kontrola vlhkosti pôdy — kŕmenie
42. deň		— počítanie juvenilných červov — meranie pH pôdy a obsahu vlhkosti v pôde

▼M6

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

39. Hoci v dodatku 7 je uvedený prehľad, žiadne definitívne štatistické usmernenia na analýzu výsledkov testu táto testovacia metóda neposkytuje.

40. V rámci testu na vyhľadávanie rozsahu je hlavným parametrom mortalita. Preto by sa mali zaznamenať aj zmeny v správaní (napr. neschopnosť zavŕtať sa do pôdy, ležanie bez pohybu pri sklenej stene testovacej nádoby) a morfológii (napr. prítomnosť otvorených rán) dospelých jedincov, ako aj existencia každého juvenilného jedinca. Na stanovenie koncentrácie LC_{50} by sa mala spravidla používať probitová analýza (21) alebo logaritmická regresia. Napriek tomu v prípadoch, keď je táto metóda analýzy nevhodná (napr. ak sú k dispozícii menej ako tri koncentrácie čiastočne spôsobujúce usmrtenie), je možné použiť alternatívne metódy. Tieto metódy môžu zahŕňať pohyblivé priemery (22), upravenú Spearman-Karberovu metódu (23) alebo jednoduchú interpoláciu (napr. geometrickú strednú hodnotu LC_0 a LC_{100}, vypočítanú ako súčin druhej odmocniny LC_0 a hodnoty LC_{100}).

41. V rámci konečného testu je hlavným parametrom plodnosť (t. j. počet narodených juvenilných jedincov). Pokiaľ však ide o test na vyhľadávanie rozsahu, všetky ostatné škodlivé príznaky by sa mali uviesť v záverečnej správe. Štatistická analýza si vyžaduje výpočet aritmetickej strednej hodnoty a štandardnej odchýlky vo vzťahu k reprodukcii pre vzorky s aplikovanou chemikáliou a kontrolné vzorky.

42. Ak sa vykonáva analýza variancie, štandardnú odchýlku (s) a stupne voľnosti (df) môže nahradiť odhad výberovej variancie, získaný postupom ANOVA, a jej stupne voľnosti, za predpokladu, že variancia nezávisí od koncentrácie. V tomto prípade sa použije jedna hodnota variancií pre kontrolné vzorky a pre vzorky s aplikovanou chemikáliou. Tieto hodnoty sa zvyčajne vypočítajú pomocou komerčného štatistického softvéru s využitím výsledkov pre jednotlivé nádoby ako replikátov. Ak sa spájanie údajov pre negatívne kontrolné vzorky a kontrolné vzorky s rozpúšťadlom zdá byť primeranejšie než porovnávanie s jednou z týchto skupín v rámci testu, malo by sa testovaním zistiť, či nie sú výrazne odlišné (vhodné testy sú uvedené v bode 45 a dodatku 7).

43. Ďalšie štatistické testovanie a odvodzovanie závisí od toho, či majú hodnoty pre replikáty normálne rozdelenie a sú homogénne, pokiaľ ide o ich varianciu.

Odhad koncentrácie NOEC

44. Uprednostniť by sa malo použitie výkonných testov. Mali by sa využívať informácie napríklad z predchádzajúcich skúseností s kruhovým testovaním alebo iné historické údaje o tom, či sú údaje približne normálne rozdelené. Homogénnosť variancie (homoskedasticita) je kritickejšia. Zo skúseností vyplýva, že variancia sa často zvyšuje s rastúcou strednou hodnotou. V týchto prípadoch by transformácia údajov mohla viesť k homoskedasticite. Taká transformácia by však mala byť založená na skúsenostiach s historickými údajmi, a nie na údajoch, ktoré sú predmetom prešetrovania. S homogénnymi údajmi by sa mali vykonať viaceré t-testy, ako napríklad Williamsov test ($\alpha = 0{,}05$, jednostranný) (24) (25), alebo v určitých prípadoch Dunnettov test (26) (27). Je potrebné si uvedomiť, že v prípade nerovnakej replikácie sa tabuľkové t-hodnoty musia upraviť, ako navrhujú

▼M6

Dunnett a Williams. Niekedy sa reakcie nezvyšujú/neznižujú pravidelne v dôsledku veľkých odchýlok. V prípade výraznej odchýlky od monotónnosti je Dunnettov test vhodnejší. Ak sa vyskytujú odchýlky od homoskedasticity, môže byť vhodné podrobnejšie preskúmať možné účinky na variancie s cieľom rozhodnúť, či sa t-testy môžu použiť bez výraznejšej straty výkonnosti (28). Alternatívne sa môžu použiť viacnásobné U-testy, napríklad Bonferroniho U-test podľa Holma (29), alebo v prípade, keď tieto údaje vykazujú heteroscedasticitu, ale inak sú v súlade so základným monotónnym priebehom krivky závislosti dávka-odpoveď, môže sa použiť iný neparametrický test [napr. Jonckheereho-Terpstrov (30) (31) alebo Shirleyho (32) (33)], pričom vo všeobecnosti sú tieto testy uprednostňované pred t-testami s nerovnakou varianciou (pozri tiež náčrt v dodatku 7).

45. Ak sa vykonáva limitný test a sú splnené podmienky postupov parametrického testu (normalita, homogenita), môže sa použiť Studentov párový t-test, alebo inak Mannov-Whitneyho postup U-testu (29).

Odhad koncentrácie EC_x

46. Pri výpočte ktorejkoľvek hodnoty EC_x sa na regresnú analýzu (lineárnu alebo nelineárnu) používajú stredné hodnoty pre jednotlivé vzorky s aplikovanou chemikáliou, a to po získaní vhodnej funkcie závislosti dávky a reakcie. Pre rast červov ako nepretržitú reakciu sa hodnoty EC_x môžu odhadnúť použitím vhodnej regresnej analýzy (35). Medzi vhodné funkcie pre kvantálne údaje (mortalita/prežitie a počet vyprodukovaných potomkov) patria bežný sigmoid, logistická alebo Weibullova funkcia s dvomi až štyrmi parametrami, pričom niektoré z týchto funkcií môžu modelovať aj hormetické reakcie. Ak sa lineárnou regresnou analýzou určila funkcia závislosti dávky a reakcie, mal by sa pred odhadom hodnoty EC_x nájsť regresnou analýzou významný koeficient determinácie (r^2) a/alebo sklon zadaním hodnoty zodpovedajúcej x % strednej hodnoty pre kontrolnú vzorku do rovnice získanej regresnou analýzou. Hranice spoľahlivosti 95 % sa vypočítajú podľa Fiellera [citovaný v práci Finneyho (21)] alebo inými modernými vhodnými metódami.

47. Alternatívne sa reakcia modeluje ako percentuálna časť alebo podiel modelového parametra, ktorý sa interpretuje ako stredná hodnota reakcie kontrolnej vzorky. V týchto prípadoch sa výsledky často môžu ľahko znázorniť normálnou (logistickou, Weibullovou) sigmoidnou krivkou s použitím postupu probitovej regresie (21). V týchto prípadoch sa váhová funkcia musí upraviť na metrické reakcie, ako uvádza Christensen (36). Ak sa však pozoruje horméza, probitovú analýzu by mala nahradiť logistická alebo Weibullova funkcia so štyrmi parametrami, určená postupom nelineárnej regresie (36). Ak z údajov nie je možné určiť vhodnú funkciu závislosti dávky a reakcie, môžu sa na odhad hodnoty EC_x a jej hraníc spoľahlivosti použiť alternatívne metódy, ako sú pohyblivé priemery podľa Thompsona (22) a upravený Spearman-Karberov postup (23).

PROTOKOL O SKÚŠKE

48. Protokol o skúške musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter, a ak je to relevantné, fyzikálno-chemické vlastnosti (napr. rozpustnosť vo vode, tlak pary),

— chemická identifikácia testovanej chemikálie podľa názvoslovia IUPAC, číslo CAS, číslo šarže, dávky, štrukturálny vzorec a čistota,

— dátum expirácie vzorky.

Testované druhy:

— použité testované živočíchy: druh, vedecký názov, zdroj organizmov a podmienky chovu,

Podmienky testu:

— zložky a príprava umelej pôdy,

▼M6

— metóda aplikácie testovanej chemikálie,

— opis testovacích podmienok vrátane teploty, obsahu vlhkosti, pH atď.,

— úplný opis koncepcie experimentu a postupov.

Výsledky testu:

— mortalita dospelých červov po dvoch týždňoch a počet juvenilných jedincov na konci testu na vyhľadávanie rozsahu,

— mortalita dospelých červov po troch týždňoch expozície a celý záznam o juvenilných jedincoch na konci konečného testu,

— akékoľvek pozorované fyzikálne alebo patologické príznaky a zmeny v správaní testovaných organizmov,

— hodnoty LC_{50}, NOEC a/alebo EC_x (napr. EC_{50}, EC_{10}) pre reprodukciu, ak sú niektoré z nich použiteľné, spolu s intervalmi spoľahlivosti a grafom, ktorý znázorňuje model ich výpočtu, ako aj všetky informácie a pozorovania, ktoré môžu byť nápomocné pri interpretácii výsledkov,

Uvedú sa odchýlky od postupov opísaných v tejto testovacej metóde a všetky nezvyčajné udalosti počas testu.

LITERATÚRA

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. Chapter C.8 of this Annex, Toxicity for Earthworms.

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

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov

Na účely tejto testovacej metódy sa používajú tieto vymedzenia pojmov:

Chemikália je látka alebo zmes.

EC_x (účinná koncentrácia x %) je koncentrácia, ktorá v rámci stanoveného času expozície vyvolá účinok x % na testované organizmy v porovnaní s kontrolnou vzorkou. V rámci tohto testu sa účinné koncentrácie vyjadrujú ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovacej pôdy.

LC_0 (nulová letálna koncentrácia) je koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá v danom časovom úseku nespôsobí usmrtenie testovaných organizmov vystavených jej pôsobeniu. V rámci tohto testu sa LC_0 vyjadruje ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovanej pôdy.

LC_{50} (stredná letálna koncentrácia) je koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá v danom časovom úseku spôsobí usmrtenie 50 % testovaných organizmov vystavených jej pôsobeniu. V rámci tohto testu sa LC_{50} vyjadruje ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovanej pôdy.

LC_{100} (absolútna letálna koncentrácia) je koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá v danom časovom úseku spôsobí usmrtenie 100 % testovaných organizmov vystavených jej pôsobeniu. V rámci tohto testu sa LC_{100} vyjadruje ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovanej pôdy.

LOEC (najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom) je najnižšia koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá má štatisticky významný účinok ($p < 0,05$). V rámci tohto testu sa LOEC vyjadruje ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovacej pôdy. Všetky testovacie koncentrácie vyššie ako LOEC by za normálnych okolností mali vyvolať účinok, ktorý je štatisticky odlišný od kontrolných vzoriek. Akékoľvek odchýlky od uvedeného pri určovaní LOEC musia byť odôvodnené v správe o teste.

NOEC (koncentrácia bez pozorovaného účinku) je najvyššia koncentrácia testovanej chemikálie, bezprostredne pod koncentráciou LOEC, pri ktorej sa nepozoruje žiadny účinok. V tomto teste koncentrácia zodpovedajúca hodnote NOEC nemá žiadny štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) v rámci daného expozičného času v porovnaní s kontrolnou vzorkou.

Miera reprodukcie je stredná hodnota počtu narodených juvenilných červov na počet dospelých červov počas testu.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

▼M6

Dodatok 2

Stanovenie maximálnej kapacity zadržiavania vody

Stanovenie kapacity zadržiavania vody umelej pôdy

Táto metóda sa považuje za vhodnú. Opísaná je v prílohe C normy ISO DIS 11268-2.

Pomocou vhodného zariadenia (špirálová trubica atď.) sa odoberie určené množstvo (napr. 5 g) testovacieho pôdneho substrátu. Spodná časť trubice sa zakryje kúskom filtračného papiera a po naplnení vodou sa umiestni na stojan vo vodnom kúpeli. Trubica by sa mala postupne ponárať do vody, až kým vodná hladina nestúpne nad vrchnú vrstvu pôdy. Potom by sa mala nechať vo vode približne tri hodiny. Keďže nie všetka voda, ktorú absorbujú kapiláry pôdy, sa môže zachovať, vzorke pôdy by sa malo umožniť odvodnenie počas dvoch hodín tak, že sa trubica uloží na vrstvu veľmi mokrého jemne drveného kremenného piesku v uzavretej nádobe (aby sa zabránilo vysúšaniu). Vzorka by sa potom mala odvážiť a vysušiť na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C. Kapacitu zadržiavania vody (WHC) je možné vypočítať takto:

$$\text{WHC (v \% suchej hmotnosti)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

kde:

S = vodou saturovaný substrát + hmotnosť trubice + hmotnosť filtračného papiera,

T = hmotnosť obalu (hmotnosť trubice + hmotnosť filtračného papiera),

D = suchá hmotnosť substrátu.

LITERATÚRA:

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**

Dodatok 3

Stanovenie ph pôdy

Táto metóda stanovenia pH vzorky pôdy je založená na opise uvedenom v norme ISO 10390 (Kvalita pôdy – stanovenie pH).

Určené množstvo pôdy sa suší pri teplote miestnosti najmenej 12 hodín. Potom sa vytvorí suspenzia pôdy (obsahujúca najmenej 5 g pôdy) s päťnásobným objemom 1 M chloridu draselného (KCl) analytickej čistoty alebo 0,01 M roztoku chloridu vápenatého ($CaCl_2$) analytickej čistoty. Suspenzia sa potom päť minút dôkladne pretrepáva. Po pretrepaní sa suspenzia nechá stáť najmenej 2 hodiny, ale nie dlhšie ako 24 hodín. Hodnota pH kvapalnej fázy sa potom meria pH-metrom, ktorý sa pred každým meraním kalibruje pomocou vhodnej série tlmivých roztokov (napr. s pH 4,0 a 7,0).

LITERATÚRA:

ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼M6

Dodatok 4

Kultivačné podmienky rodu *Enchytraeus*

Červy druhu *Enchytraeus albidus* (ako aj iné druhy rodu *Enchytraeus*) z čeľade *Enchytraeidae* je možné kultivovať vo veľkých plastových boxoch (napr. s rozmermi 30 × 60 × 10 cm) naplnených zmesou 1:1 umelo pripravenej pôdy a prírodnej nekontaminovanej záhradnej pôdy. Kompostový materiál sa nesmie používať, lebo by mohol obsahovať toxické chemikálie, ako sú ťažké kovy. Faunu je potrebné z pôdy pred použitím odstrániť (napr. hlbokým zmrazením). Použiť sa môže aj substrát tvorený len umelou pôdou, ale miera reprodukcie môže byť nižšia, než sa dosiahne pomocou zmiešaného pôdneho substrátu. Substrát, ktorý sa používa na kultiváciu, by mal mať hodnotu pH 6,0 ± 0,5.

Kultúra sa uchováva v tme pri teplote 15 – 20 °C ± 2 °C. Je potrebné zabrániť stúpnutiu teploty nad 23 °C. Pôda sa musí udržiavať vlhká, ale nie mokrá. Správny obsah vlhkosti v pôde sa prejaví malými kvapkami vody medzi prstami pri jemnom stláčaní pôdy. Musí sa predchádzať vzniku anoxických podmienok tým, že sa zabezpečí, aby veká kultivačných nádob umožňovali primeranú výmenu plynov s atmosférou. Pôda by sa mala každý týždeň opatrne rozrušiť, aby sa uľahčilo prevzdušňovanie.

Červy sa môžu kŕmiť ovsenými vločkami. Vločky by sa mali skladovať v hermeticky uzavretých nádobách a pred použitím by sa mali autoklávovať alebo zahriať, aby sa zabránilo zamoreniu múčnymi roztočmi (napr. rod *Glyzyphagus*, *Astigmata*, *Acarina*) alebo dravými roztočmi [napríklad *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*]. Po tepelnom ošetrení by sa mala potrava rozomlieť, aby ju bolo možné ľahko rozsypať na povrch pôdy. Z času na čas sa ovsené otruby môžu doplniť pridaním vitamínov, mlieka a oleja z trsčej pečene. Inými vhodnými zdrojmi potravy sú pekárske kvasnice a krmivo pre ryby Tetra-Min.

Kŕmenie prebieha približne dvakrát týždenne. Primerané množstvo ovsených otrúb sa rozsype na povrch pôdy alebo sa opatrne zamieša do substrátu pri rozrušovaní pôdy na uľahčenie prevzdušňovania. Absolútne množstvo poskytnutej potravy závisí od počtu červov prítomných v substráte. Ako usmernenie platí, že množstvo potravy by sa malo zvýšiť, ak sa všetka spotrebuje počas dňa, keď bola poskytnutá. Naopak, ak potrava zostáva na povrchu aj v čase druhého kŕmenia (o týždeň neskôr), jej množstvo by sa malo znížiť. Potrava kontaminovaná rastom plesní by sa mala odstrániť a nahradiť. Po troch mesiacoch by sa červy mali presunúť do čerstvo pripraveného substrátu.

Kultivačné podmienky sa považujú za vyhovujúce, ak sa červy: a) nepokúšajú opustiť pôdny substrát, b) rýchlo pohybujú v pôde, c) majú lesklý vonkajší povrch bez prichytených častíc pôdy, d) majú viac-menej belavú farbu, e) vykazujú v kultúrach rozličné vekové kategórie a f) sústavne sa reprodukujú.

▼M6

Dodatok 5

Vykonanie testu s inými druhmi rodu *Enchytraeus*

Výber druhov

Použiť sa môžu aj iné druhy než *E. albidus*, ale zodpovedajúcim spôsobom by sa mal upraviť postup testovania a kritériá platnosti. Keďže mnohé druhy rodu *Enchytraeus* sú ľahko dostupné a je možné ich uspokojivo udržiavať v laboratóriu, najdôležitejším kritériom pri výbere iných druhov ako *E. albidus* je ekologický význam, ako aj ich porovnateľná citlivosť. Na zmenu druhov môžu byť aj formálne dôvody. Napríklad v krajinách, kde sa druh *E. albidus* nevyskytuje a nie je možné ho dovážať (napr. v dôsledku karanténnych obmedzení), bude potrebné použiť iný druh rodu *Enchytraeus*.

Príklady vhodných alternatívnych druhov

— *Enchytraeus crypticus* (Westheide a Graefe 1992): v posledných rokoch sa tento druh často používa v ekotoxikologických štúdiách pre jednoduchosť chovu a testovania. Je však malý, a preto je manipulácia s ním zložitejšia v porovnaní s druhom *E. albidus* (najmä v štádiách pred použitím metódy farebného označovania). V prípade druhu *E. crypticus* nebolo s istotou zistené, či sa vyskytuje na poliach, a opísaný bol iba z kultúr dážďoviek. Jeho ekologické potreby preto nie sú známe.

— *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): názov pravdepodobne zahŕňa skupinu blízko príbuzných druhov, ktoré sú morfologicky ťažko rozlíšiteľné. Jeho použitie na testovanie sa neodporúča, pokiaľ jedince, ktoré by sa mali použiť v rámci testu, nie je možné druhovo identifikovať. Červy druhu *E. buchholzi* sa zvyčajne vyskytujú na lúkach a v narušených oblastiach, ako je okolie ciest.

— *Enchytraeus luxuriosus*: tento druh bol pôvodne známy ako *E. minutus*, a bol opísaný až nedávno (1). Prvýkrát ho objavil U. Graefe (Hamburg) na lúke v blízkosti St. Peter-Ording (spolková krajina Šlezvicko-Holštajnsko, Nemecko). Červy druhu *E. luxuriosus* majú približne polovičnú veľkosť v porovnaní s druhom *E. albidus*, ale sú väčšie v porovnaní s ostatnými uvádzanými druhmi, čo by z nich mohlo robiť dobrú alternatívu druhu *E. albidus*.

— *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen a Christensen 1963): tento druh bol doteraz hlásený z Nemecka a Španielska, kde žije v minerálnych pôdach a jeho výskyt je bežný, ale obvykle nie veľmi hojný. V porovnaní s inými malými druhmi tohto rodu je pomerne ľahko identifikovateľný. Nič nie je známe o jeho správaní v rámci laboratórnych testov ani o jeho citlivosti na chemikálie. Zistilo sa však, že sa ľahko kultivuje (E. Belotti, osobná komunikácia).

Chovné podmienky

Všetky uvedené druhy rodu *Enchytraeus* je možné kultivovať v rovnakých substrátoch, aké sa používajú v prípade druhu *E. albidus*. Ich menšia veľkosť znamená, že kultivačné nádoby môžu byť menšie a že sa síce môže používať rovnaká potrava, ale musí sa upraviť veľkosť dávky. Životný cyklus týchto druhov je kratší ako v prípade druhu *E. albidus*, preto by sa kŕmenie malo vykonávať častejšie.

Podmienky testu

Podmienky testu sú vo všeobecnosti rovnaké ako tie, ktoré sa vzťahujú na druh *E. albidus*, okrem toho, že

— veľkosť testovacej nádoby môže (ale nemusí) byť menšia,

— čas trvania reprodukčného testu môže (ale nemusí) byť kratší, t. j. štyri namiesto šiestich týždňov, pričom čas trvania testu na vyhľadávanie rozsahu by sa nemal meniť,

— vzhľadom na malé rozmery juvenilných červov sa dôrazne odporúča použiť pri počítaní metódu farebného označovania;

— kritérium platnosti vzťahujúce sa na počet juvenilných jedincov na testovaciu nádobu v kontrolnej vzorke by sa malo zmeniť na „50“.

▼**M6**

LITERATÚRA

(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

Dodatok 6

Podrobný opis techník extrakcie

Farebné označovanie bengálskou červeňou

Použitie tejto metódy, pôvodne vyvinutej pre sladkovodné životné prostredie (1), na počítanie juvenilných jedincov čeľade *Enchytraeidae* prvýkrát navrhol W. De Coen (Univerzita Gent, Belgicko) v rámci reprodukčného testu čeľade Enchytraeidae. Upravenú verziu (bengálska červeň zmiešaná s formaldehydom namiesto etanolu) nezávisle vypracoval inštitút RIVM v Bilthovene (2) (3).

Na konci konečného testu (t. j. po šiestich týždňoch) sa pôda z testovacích nádob prenesie do plytkej nádoby. Vhodná na tento účel je bellaplastová nádoba alebo fotografická miska s rebrovaným dnom, lebo „rebrá“ obmedzujú pohyb červov v oblasti pozorovania. Mladé jedince sú fixované etanolom (približne 5 ml na replikát). Do nádob sa potom naleje voda tak, aby tvorila vrstvu 1 – 2 cm. Pridá sa niekoľko kvapiek (200 – 300 µl) bengálskej červene (1 % roztok v etanole) (alternatívou je 0,5 % eozín) a obidve zložky sa dôkladne premiešajú. Po 12 hodinách by mali byť červy červenkasto sfarbené a malo by byť možné ich ľahko spočítať, lebo budú ležať na povrchu substrátu. Alternatívne sa môže zmes substrátu a alkoholu pred spočítaním červov preprať cez sito (veľkosť ôk: 0,25 mm). Použitím tohto postupu sa kaolinit, rašelina a časť piesku vymyjú a červenkasté červy sa budú jednoduchšie vyhľadávať a počítať. Počítanie uľahčí aj použitie šošoviek s osvetlením (šošovky s veľkosťou najmenej 100 × 75 mm a s dvojnásobným až trojnásobným faktorom zväčšenia).

Technika farebného označovania skracuje čas počítania na niekoľko minút na nádobu a ako usmernenie platí, že by malo byť možné, aby jedna osoba bola schopná posúdiť všetky nádoby z jedného testu v priebehu maximálne dvoch dní.

Mokrá extrakcia

Mokrá extrakcia by sa mala začať okamžite po skončení testu. Pôda z každej testovacej nádoby sa umiestni do plastových sít s veľkosťou ôk približne 1 mm. Sitá sa potom zavesia do plastových misiek bez dotyku s dnom. Misky sa opatrne naplnia vodou tak, aby vzorky v sitách boli úplne pod vodnou hladinou. S cieľom zabezpečiť výťažnosť viac ako 90 % prítomných červov by extrakcia mala prebiehať tri dni pri teplote 20 °C ± 2 °C. Po skončení extrakcie sa sitá vyberú a voda (s výnimkou malého množstva) sa pomaly vyleje, pričom sa dbá na to, aby sa nenarušil sediment na dne misiek. Plastové misky sa potom mierne pretrepú, aby suspendoval sediment vo vrstve vody. Voda sa preleje do Petriho misky a po usadení častíc pôdy sa môžu červy čeľade *Enchytraeidae* identifikovať, premiestniť a spočítať s použitím stereomikroskopu a jemnej oceľovej pinzety.

Flotácia

Metódu založenú na flotácii opísal vo svojej práci R. Kuperman (4). Po fixovaní obsahu testovacej nádoby etanolom sa pôda zaleje prípravkom Ludox (koloidný silikát AM-30, 30 hm. % suspenzia vo vode) do výšky 10 – 15 mm nad povrch pôdy. Po dôkladnom premiešaní pôdy s flotačným činidlom v trvaní 2 – 3 minút plávajú juvenilné červy na povrchu a je možné ich ľahko spočítať.

LITERATÚRA

1. Kořínková, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestník Československé Společnosti Zoologické 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.

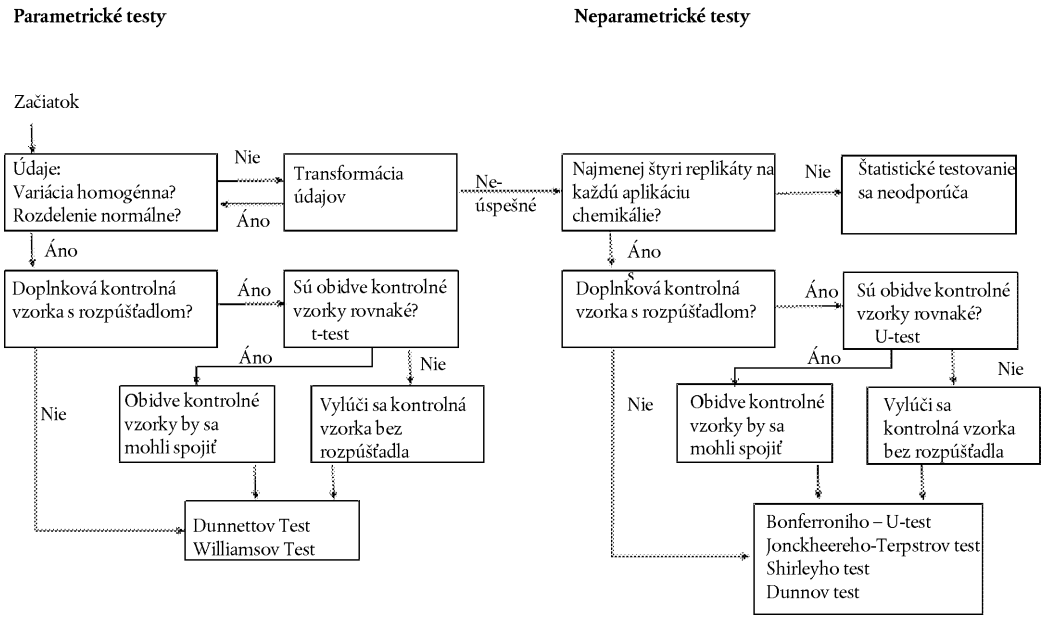
3. Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. and Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. Ecotox. Envir. Safety 38, 108-121.

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

Dodatok 7

Prehľad štatistického posúdenia údajov (stanovenie hodnoty NOEC)



▼M6

C.33. REPRODUKČNÝ TEST S DÁŽĎOVKAMI (*EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI*)

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 222 (2004). Je určená na posúdenie účinkov chemikálií v pôde na reprodukčný výstup (a ďalších subletálnych parametrov) dážďoviek druhu *Eisenia fetida* (Savigny 1826) alebo *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1) (2). Metóda bola podrobená kruhovému testu (3). Existuje testovacia metóda pre test akútnej toxicity pre dážďovky (4). Uverejnené boli viaceré iné medzinárodné a vnútroštátne usmernenia pre akútne a chronické testy s dážďovkami (5) (6) (7) (8).

2. Druhy *Eisenia fetida* a *Eisenia andrei* sa považujú za jedných zo zástupcov pôdnej fauny a predovšetkým dážďoviek. Základné informácie o ekológii dážďoviek a ich používaní v ekotoxikologickom testovaní sú k dispozícii v literatúre (7) (9) (10) (11) (12).

PRINCÍP TESTU

3. Dospelé červy sú vystavené účinkom rôznych koncentrácií testovanej chemikálie, buď zamiešanej do pôdy, alebo, v prípade pesticídov, aplikovanej na povrch alebo do pôdy s použitím postupov, ktoré sú v súlade so spôsobom používania chemikálie. Metóda aplikácie je špecifická na účely testu. Rozsah testovacích koncentrácií sa vyberá tak, aby zahŕňal tie, ktoré môžu počas ôsmich týždňov spôsobiť subletálne i letálne účinky. Účinky na mortalitu a rast dospelých červov sa stanovia po štyroch týždňoch expozície. Dospelé jedince sa potom vyberú z pôdy a účinky na reprodukciu sa posudzujú po ďalších štyroch týždňoch sčítaním počtu potomstva prítomného v pôde. Výstup reprodukcie červov vystavených testovanej chemikálii sa porovnáva s reprodukčným výstupom kontrolných vzoriek s cieľom stanoviť hodnoty i) koncentrácie bez pozorovaného účinku (NOEC) a/alebo ii) koncentrácie EC_x (napr. EC_{10}, EC_{50}) pomocou regresného modelu na odhad koncentrácie, ktorá by spôsobila zníženie reprodukčného výstupu o x %. Koncentrácia EC_x (napr. EC_{10}, EC_{50}) by mala byť v rozsahu testovacích koncentrácií, aby sa potom hodnota EC_x určila interpoláciou namiesto extrapolácie (pozri vymedzenie pojmov v dodatku 1).

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

4. Na pomoc pri vypracovaní vhodných postupov testovania by mali byť k dispozícii tieto informácie týkajúce sa testovanej chemikálie:

   — rozpustnosť vo vode,

   — log K_{ow},

   — tlak pary

   — a ak je to možné, informácie o osude a správaní testovanej chemikálie v životnom prostredí (napr. rýchlosť fotolýzy a hydrolýzy, pokiaľ je to dôležité z hľadiska spôsobov aplikácie).

5. Táto testovacia metóda sa môže použiť na všetky chemikálie bez ohľadu na ich rozpustnosť vo vode. Testovacia metóda nie je použiteľná v prípade prchavých chemikálií, vymedzených na tento účel ako chemikálie, pre ktoré je hodnota Henryho konštanty alebo rozdeľovacej konštanty vzduch/voda vyššia ako jeden, alebo chemikálie, pre ktoré tlak pary pri teplote 25 °C presahuje hodnotu 0,0133 Pa.

6. V rámci tejto testovacej metódy neexistuje žiadna povolená odchýlka, pokiaľ ide o možnú degradáciu testovanej chemikálie počas celého trvania testu. Následne nie je možné predpokladať, že expozičné koncentrácie sa počas celého testu budú udržiavať na počiatočných hodnotách. V tom prípade sa odporúča vykonať chemickú analýzu testovanej chemikálie na začiatku a na konci testu.

▼M6

REFERENČNÁ CHEMIKÁLIA

7. S cieľom zabezpečiť, aby boli laboratórne podmienky testu primerané, a overiť, či sa reakcia testovaných organizmov postupom času štatisticky výrazne nezmenila, sa musia stanoviť hodnoty NOEC a/alebo EC_x referenčnej chemikálie. Odporúča sa testovať referenčnú chemikáliu najmenej raz ročne, alebo ak sa testovanie vykonáva zriedkavejšie, súbežne so stanovením toxicity testovanej chemikálie. Vhodnými referenčnými chemikáliami sú karbendazim a benomyl, pri ktorých sa preukázalo, že ovplyvňujú reprodukciu (3). Výrazné účinky by sa mali pozorovať pri hodnotách a) 1 – 5 mg účinnej zložky/kg suchej hmotnosti alebo b) 250 – 500 g/ha alebo 25 – 50 mg/m^2. Ak sa do série testov zahrnie pozitívny štandard toxicity, použije sa jedna koncentrácia a počet replikátov by mal byť rovnaký ako pri kontrolných vzorkách.

PLATNOSŤ TESTU

8. Na to, aby sa výsledok testu považoval za platný, by kontrolné vzorky mali spĺňať tieto kritériá:

— v každom replikáte (obsahujúcom 10 dospelých jedincov) by malo byť do konca testu vyprodukovaných ≥ 30 juvenilných jedincov,

— variačný koeficient reprodukcie by mal byť ≤ 30 %,

— mortalita dospelých jedincov počas počiatočných 4 týždňov testu by mala byť ≤ 10 %.

Ak test nespĺňa uvedené kritériá platnosti, jeho vykonávanie by sa malo ukončiť, pokiaľ nie je možné predložiť odôvodnenie pokračovania testu. Toto odôvodnenie by malo byť zahrnuté do protokolu o skúške.

OPIS TESTU

Zariadenia

9. Používať by sa mali testovacie nádoby vyrobené zo skla alebo iného chemicky inertného materiálu s objemom približne jeden až dva litre. Nádoby by mali mať v priereze plochu približne 200 cm^2, aby sa dosiahla hĺbka vlhkého substrátu okolo 5 – 6 cm, keď sa pridá 500 – 600 g sušiny substrátu. Konštrukcia veka nádoby by mala umožniť výmenu plynov medzi substrátom a atmosférou a prístup svetla (napr. perforované priesvitné veko) a zároveň zabrániť úniku červov. Ak je množstvo používaného testovacieho substrátu podstatne väčšie než 500 – 600 g na jednu testovaciu nádobu, počet červov by sa mal úmerne zvýšiť.

10. Potrebné je bežné laboratórne vybavenie, konkrétne toto:

— skrinka na sušenie,

— stereomikroskop,

— pH-meter a fotometer,

— vhodné presné váhy,

— primerané zariadenie na regulovanie teploty,

— primerané zariadenie na regulovanie vlhkosti (nie je to nevyhnutné, ak nádoby s exponovanými vzorkami majú veká),

— inkubátor alebo malá miestnosť s klimatizačným zariadením,

— pinzety, háčiky alebo slučky,

— vodný kúpeľ.

▼M6

Príprava umelej pôdy

11. V tomto teste sa používa umelo pripravená pôda (5) (7) s týmto zložením (na základe sušiny vysušenej na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C):

— 10 percent rašeliny (pH čo najbližšie k hodnotám 5,5 – 6,0, bez viditeľných rastlinných zvyškov, jemne mletá, vysušená na meraný obsah vlhkosti),

— 20 percent kaolínovej hliny (obsah kaolinitu podľa možnosti nad 30 percent),

— 0,3 – 1 % uhličitanu vápenatého ($CaCO_3$, práškový, analytickej čistoty) na dosiahnutie počiatočnej hodnoty pH 6,0 ± 0,5,

— 70 % vzduchom vysušeného kremenného piesku (v závislosti od potrebného množstva $CaCO_3$), prevažne jemný piesok s viac ako 50 % častíc s veľkosťou od 50 do 200 mikrónov.

Poznámka 1: potrebné množstvo $CaCO_3$ bude závisieť od zložiek pôdneho substrátu vrátane potravy a malo by sa stanoviť meraním čiastkových vzoriek pôdy tesne pred testom; hodnota pH sa meria v zmiešanej vzorke roztoku 1 M chloridu draselného (KCl) alebo 0,01 M roztoku chloridu vápenatého ($CaCl_2$) (13).*Poznámka 2:* Obsah organického uhlíka v umelo pripravenej pôde môže klesnúť, napríklad znížením obsahu rašeliny na 4 – 5 % a zodpovedajúcim zvýšením obsahu piesku. V dôsledku takéhoto poklesu obsahu organického uhlíka sa môžu znížiť možnosti adsorpcie testovanej chemikálie na pôdu (organický uhlík) a dostupnosť testovanej chemikálie pre červy sa môže zvýšiť. Preukázalo sa, že červy druhu *Eisenia fetida* môžu spĺňať kritériá platnosti reprodukcie v prípade, keď sa testy vykonávajú v poľných pôdach s nižším obsahom organického uhlíka (napr. 2,7 %) (14), a existujú praktické skúsenosti potvrdzujúce, že toto je možné dosiahnuť aj v umelo pripravenej pôde s 5 % rašeliny. Preto nie je potrebné pred použitím takejto pôdy na konečný test preukazovať, že umelo pripravená pôda je vhodná na dosiahnutie súladu s kritériami platnosti testu, pokiaľ obsah rašeliny neklesne viac, ako bolo uvedené.*Poznámka 3:* Vhodnosť pôdy a splnenie kritérií platnosti testu by sa mali preukázať aj v prípade použitia prírodnej pôdy v ďalšom testovaní (napr. vyššieho stupňa).

12. Suché zložky pôdy sa dôkladne zmiešajú (napr. vo veľkokapacitnom laboratórnom miešači) v dobre vetranom priestore. Pred začiatkom testu sa suchá umelo pripravená pôda zvlhčí pridaním dostatočného množstva deionizovanej vody, aby sa dosiahla približne polovica konečného obsahu vody, čo je 40 – 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody (čo zodpovedá 50 % ± 10 % vlhkosti sušiny). Tým vznikne substrát, v ktorom sa pri stláčaní rukou neobjaví stojaca ani voľná voda. Maximálna kapacita zadržiavania vody umelej pôdy sa stanoví v súlade s postupmi uvedenými v dodatku 2 k norme ISO 11274 (15) alebo v rovnocennej norme EÚ.

13. Ak sa testovaná chemikália aplikuje na povrch pôdy alebo sa zamieša do pôdy bez vody, konečné množstvo vody sa môže zamiešať do umelo pripravnej pôdy počas prípravy pôdy. Ak sa testovaná chemikália zamieša do pôdy spolu s určitým množstvom vody, ďalšia voda sa môže pridať spolu s testovanou chemikáliou (pozri bod 19).

14. Obsah vlhkosti v pôde sa stanoví na začiatku a na konci testu v súlade s normou ISO 11465 (16) alebo rovnocennou normou EÚ a hodnota pH pôdy sa stanoví v súlade s dodatkom 3 alebo normou ISO 10390 (13) alebo rovnocennou normou EÚ. Tieto hodnoty by sa mali stanoviť z kontrolnej

▼M6

vzorky pôdy a zo vzorky pôdy s každou testovanou koncentráciou. Hodnota pH pôdy by sa pri testovaní kyslých alebo zásaditých chemikálií nemala upravovať. Obsah vlhkosti by sa mal monitorovať počas celého testu pravidelným vážením nádob (pozri body 26 a 30).

Výber a príprava testovacích živočíchov

15. Živočíšne druhy použité v teste sú *Eisenia fetida* alebo *Eisenia andrei* (1) (2). Na začiatok testu sú potrebné dospelé červy vo veku dva mesiace až jeden rok a s vyvinutým opaskom (clitellum). Červy by sa mali vybrať zo synchronizovanej kultúry s relatívne homogénnou vekovou štruktúrou (dodatok 4). Jedinci v rámci skupiny by sa nemali líšiť vo veku o viac ako 4 týždne.

16. Vybraté červy by sa mali aklimatizovať najmenej jeden deň s typom umelého pôdneho substrátu, ktorý sa má použiť v rámci testu. Počas tohto obdobia by sa červy mali kŕmiť tou istou potravou, ktorá sa má použiť v rámci testu (pozri body 31 – 33).

17. Na začiatku testu by sa mali skupiny 10 červov jednotlivo vážiť a náhodne zaraďovať do testovacích nádob. Červy sa pred vážením umyjú (deionizovanou vodou) a prebytočná voda sa odstráni tak, že sa červy nakrátko položia na filtračný papier. Čerstvá hmotnosť jednotlivých červov by mala dosahovať hodnotu od 250 do 600 mg.

Príprava testovaných koncentrácií

18. Použiť sa môžu dve metódy aplikácie testovanej chemikálie: miešanie testovanej chemikálie do pôdy (pozri body 19 – 21) alebo aplikácia na povrchu pôdy (pozri body 22 – 24). Výber vhodnej metódy závisí od účelu testu. Vo všeobecnosti sa odporúča miešanie testovanej chemikálie do pôdy. Môžu však byť potrebné postupy aplikácie, ktoré sú v súlade s bežnou poľnohospodárskou praxou (napr. nástrek kvapalného prípravku alebo použitie špeciálnych prípravkov na ochranu rastlín, ako sú granuly alebo moridlá osiva). Rozpúšťadlá používané na pomoc pri aplikovaní testovanej chemikálie do pôdy by sa mali vyberať na základe ich nízkej toxicity pre dážďovky a do koncepcie testu musí byť zahrnutá primeraná kontrola rozpúšťadla (pozri bod 27).

Miešanie testovanej chemikálie do pôdy

Testovaná chemikália rozpustná vo vode

19. Roztok testovanej chemikálie v deionizovanej vode sa pripravuje tesne pred začiatkom testu v množstve dostatočnom pre všetky replikáty jednej koncentrácie. Na uľahčenie prípravy testovacieho roztoku môže byť potrebné pomocné rozpúšťadlo. Je vhodné pripraviť také množstvo roztoku, aké je potrebné na dosiahnutie konečného obsahu vlhkosti (40 – 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody). Roztok sa pred vložením do testovacej nádoby dôkladne premieša s pôdnym substrátom.

Testovaná chemikália nerozpustná vo vode

20. Testovaná chemikália sa rozpustí v malom objeme vhodného organického rozpúšťadla (napr. acetónu) a potom sa nastrieka na malé množstvo jemného kremenného piesku, alebo sa s ním zmieša. Rozpúšťadlo sa potom odstráni aspoň niekoľkominútovým odparovaním pod digestorom. Piesok s aplikovanou chemikáliou sa následne dôkladne zmieša s predvlhčenou umelo pripravenou pôdou. Potom sa pridá a zamieša deionizovaná voda (potrebné množstvo), aby sa dosiahol konečný obsah vlhkosti 40 – 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody. Pôda je tým pripravená na vloženie do testovacích nádob. Je potrebné dbať na to, že niektoré rozpúšťadlá môžu byť toxické pre dážďovky.

▼M6

Testovaná chemikália rozpustná vo vode a v organických rozpúšťadlách

21. Pripraví sa zmes zložená z 10 g jemne drveného priemyselného kremenného piesku a testovanej chemikálie v množstve potrebnom na dosiahnutie testovanej koncentrácie v pôde. Zmes sa potom dôkladne premieša s predvlhčenou umelo pripravenou pôdou. Potom sa pridá a zamieša deionizovaná voda (potrebné množstvo), aby sa dosiahol konečný obsah vlhkosti 40 – 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody. Pôda je tým pripravená na vloženie do testovacích nádob.

Aplikácia testovanej chemikálie na povrch pôdy

22. Testovaná chemikália sa aplikuje do pôdy až po vložení červov. Testovacie nádoby sa najskôr naplnia navlhčeným pôdnym substrátom a na povrch sa uložia odvážené červy. Zdravé červy sa spravidla okamžite zahrabú do substrátu a následne sa všetky, ktoré zostanú na povrchu aj po 15 minútach, označia za poškodené a musia sa vymeniť. Ak sa červy vymenia, tie nové aj tie nahradené by sa mali odvážiť, aby bola známa celková živá hmotnosť skupiny červov vystavených pôsobeniu chemikálie a celková hmotnosť nádoby s červami na začiatku testu.

23. Aplikuje sa testovaná chemikália. Nemala by sa pridávať do pôdy skôr ako pol hodiny po vložení červov (alebo kým sa červy nachádzajú na povrchu pôdy), aby sa tak predišlo akejkoľvek priamej expozícii testovanej chemikálie pri styku s povrchom tela. Ak je testovanou chemikáliou pesticíd, môže byť vhodné aplikovať ho na povrch pôdy striekaním. Testovaná chemikália by sa mala aplikovať na povrch pôdy čo najrovnomernejšie použitím vhodného laboratórneho striekacieho zariadenia, aby sa simulovala aplikácia pri postreku na poli. Pred aplikáciou by sa malo odobrať veko testovacej nádoby a nahradiť vložkou, ktorá chráni bočné steny nádoby pred postrekom. Vložka sa môže vyrobiť z testovacej nádoby s odstráneným podstavcom. Aplikácia by sa mala vykonať pri teplote v rozsahu 20 °C ± 2 °C a v prípade vodných roztokov, emulzií alebo disperzií pri aplikačnej dávke vody 600 – 800 µl/m2. Veľkosť dávky by sa mala overiť pomocou vhodnej kalibračnej metódy. Osobitné prípravky ako granuly alebo moridlá osiva by sa mali používať spôsobom, ktorý je v súlade s poľnohospodárskym použitím.

24. Testovacie nádoby by sa mali hodinu nechať odkryté, aby sa mohlo odpariť prchavé rozpúšťadlo použité pri aplikácii testovanej chemikálie. Treba dbať na to, aby žiadny červ v priebehu tohto času neunikol z testovacích nádob.

POSTUP

Testované skupiny a kontrolné vzorky

25. Odporúča sa vložiť 10 dážďoviek do 500 – 600 g sušiny umelo pripravenej pôdy (t. j. 50 – 60 g pôdy na červa). Ak sa použijú väčšie množstvá pôdy, čo by mohol byť prípad testovania pesticídov s osobitnými spôsobmi aplikácie, napríklad pomocou moridla osiva, mal by sa pri vkladaní zachovať pomer 50 – 60 g pôdy na jedného červa, a to zvýšením počtu červov. Pre každú nádobu s kontrolnou vzorkou a so vzorkou s aplikovanou chemikáliou sa pripraví desať červov. Červy sa umyjú vodou, otrú a potom sa nakrátko uložia na absorpčný papier, čo umožní, aby odtiekla prebytočná voda.

26. S cieľom predísť systematickým chybám v rozdelení červov do testovacích nádob by sa mala určiť homogenita testovanej populácie individuálnym vážením 20 červov náhodne vybratých z populácie, z ktorej sa majú vybrať testované červy. Po zabezpečení homogenity sa vyberú šarže červov, odvážia sa a metódou náhodného výberu sa zaradia do testovacích nádob.

▼M6

Po vložení testovacích červov by sa mala odmerať hmotnosť každej testovacej nádoby, aby sa zabezpečil údaj o počiatočnej hmotnosti, ktorý sa môže použiť ako základ na monitorovanie obsahu vlhkosti v pôde pomocou testu uvedeného v bode 30. Testovacie nádoby sa potom uzavrú, ako je opísané v bode 9, a uložia do testovacej komory.

27. Pre každú z metód aplikácie testovanej chemikálie opísaných v bodoch 18 – 24 sa pripraví vhodná kontrolná vzorka. Pri príprave kontrolných vzoriek sa dodržiavajú príslušné uvedené postupy, s výnimkou toho, že sa nepridá testovaná chemikália. Preto ak je to potrebné, do kontrolných vzoriek sa pridávajú organické rozpúšťadlá, kremenný piesok alebo iné nosiče v koncentráciách/množstvách, ktoré sú v súlade s rovnakými parametrami používanými pri vzorkách s aplikovanou chemikáliou. Ak sa na pridávanie testovanej chemikálie používa rozpúšťadlo alebo iný nosič, mala by sa pripraviť a otestovať aj doplnková kontrolná vzorka bez nosiča alebo testovanej chemikálie, aby sa zabezpečilo, že nosič nemá vplyv na výsledok.

Podmienky testu

28. Testovacia teplota je 20 °C ± 2 °C. Test sa vykonáva za kontrolovaných cyklov svetla a tmy (podľa možnosti 16 hodín svetla a 8 hodín tmy) s intenzitou osvetlenia 400 – 800 luxov v okolí testovacích nádob.

29. Testovacie nádoby sa počas testu neprevzdušňujú, ale konštrukcia veka testovacej nádoby by mala umožniť výmenu plynov a zároveň obmedziť odparovanie vlhkosti (pozri bod 9).

30. Obsah vody v pôdnom substráte v testovacích nádobách sa počas celého testu udržiava opakovaným vážením testovacích nádob (bez ich viek). Straty sa podľa potreby dopĺňajú deionizovanou vodou. Obsah vody by sa od začiatku testu nemal meniť o viac ako 10 %.

Kŕmenie

31. Akákoľvek potrava, ktorá je vhodná prinajmenšom na udržanie hmotnosti červa počas testu, sa považuje za prijateľnú. Zo skúseností vyplynulo, že vhodnou potravou je ovsená múka, kravský alebo konský hnoj. Kontroly by mali zabezpečiť, že kravy alebo kone, od ktorých sa hnoj získava, nepodstupujú liečbu alebo ošetrovanie chemickými látkami, ako sú rastové stimulátory, nematicídy alebo podobné veterinárne produkty, ktoré by mohli mať počas testu nepriaznivý vplyv na červy. Odporúča sa kravský hnoj získaný z vlastných zdrojov, lebo zo skúseností vyplynulo, že komerčne dostupný kravský hnoj, používaný ako záhradné hnojivo, môže mať nepriaznivé účinky na červy. Hnoj by sa mal pred použitím vysušiť vzduchom, jemne zomlieť a pasterizovať.

32. Každá čerstvá šarža potravy by sa pred použitím v rámci testu mala najskôr poskytnúť kultúre červov, ktorá sa na teste nepodieľa, aby sa zabezpečilo, že má dostatočnú kvalitu. Rast a produkcia kokónov by sa nemali znížiť v porovnaní s červami chovanými v substráte, ktorý neobsahuje potravu z novej šarže [podmienky, ako sú uvedené v testovacej metóde C.8 (4)].

33. Potrava sa prvýkrát poskytne jeden deň po pridaní červov a aplikácii testovanej chemikálie do pôdy. Približne 5 g potravy sa rozloží na povrch pôdy v každej nádobe a zvlhčí deionizovanou vodou (približne 5 – 6 ml na nádobu). Potom sa potrava poskytuje raz týždenne počas 4 týždňov trvania

▼M6

testu. Ak potrava zostáva neskonzumovaná, dávka by sa mala znížiť, aby sa zabránilo rastu a vytváraniu plesní. V 28. deň testu sa dospelé jedince vyberú z pôdy. Do každej testovacej nádoby sa potom podá ďalších 5 gramov potravy. V priebehu zostávajúcich 4 týždňov testu už žiadne ďalšie kŕmenie neprebieha.

Výber testovaných koncentrácií

34. Predchádzajúce poznatky o toxicite testovanej chemikálie by mali pomôcť pri výbere vhodných testovaných koncentrácií, napríklad z testu akútnej toxicity (4) a/alebo zo štúdií týkajúcich sa vyhľadávania rozsahu. V prípade potreby sa vykoná test na vyhľadávanie rozsahu, napríklad s piatimi testovanými koncentráciami: 0,1, 1,0, 10, 100 a 1 000 mg/kg (pôdnej sušiny). Na každú vzorku s aplikovanou chemikáliou a kontrolnú vzorku stačí jeden replikát. Test na vyhľadávanie rozsahu trvá dva týždne a na konci testu sa posudzuje mortalita.

Koncepcia experimentu

35. Keďže testu nei je možné predpísať jediný súhrnný štatistický údaj, táto testovacia metóda umožňuje stanovenie hodnôt NOEC a EC_x. Je pravdepodobné, že regulačné orgány budú v dohľadnej budúcnosti vyžadovať hodnotu koncentrácie NOEC. Je tiež možné, že v blízkej budúcnosti sa zavedie širšie využívanie hodnoty EC_x, vyplývajúce zo štatistických a ekologických aspektov. Preto sa na základe odporúčaní vychádzajúcich z kruhového testu metódy testovania reprodukcie čeľade *Enchytraeidae* navrhujú tri koncepcie (17).

36. Pri stanovení rozsahu koncentrácií je treba mať na zreteli:

— na stanovenie hodnoty NOEC by sa malo testovať aspoň päť/dvanásť koncentrácií v geometrickej sérii. Odporúčajú sa štyri replikáty na každú testovanú koncentráciu a osem kontrolných vzoriek. Faktor rozstupu medzi hodnotami koncentrácie by nemal presahovať 2,0.

— Na stanovenie hodnoty EC_x (napr. EC_{10}, EC_{50}) sa odporúča testovať primeraný počet koncentrácií, ktoré vyvolajú aspoň štyri štatisticky významne odlišné stredné reakcie na tieto koncentrácie. Odporúčajú sa najmenej dva replikáty pre každú testovanú koncentráciu a šesť kontrolných replikátov. Faktor rozstupu sa môže meniť, t. j. môže mať hodnotu najviac 1,8 v očakávanom rozsahu účinkov a viac ako 1,8 pri vyšších a nižších koncentráciách.

— Kombinovaný prístup umožňuje určenie obidvoch koncentrácií, NOEC aj EC_x. Použiť by sa malo osem koncentrácií aplikovanej chemikálie v geometrickom rade. Odporúčajú sa štyri replikáty pre každú aplikáciu chemikálie a osem kontrolných vzoriek. Faktor rozstupu medzi hodnotami koncentrácie by nemal presahovať 1,8.

Trvanie testu a merania

37. V 28. deň sa skontrolujú a spočítajú žijúce dospelé červy. Zaznamenať by sa mali aj zmeny v správaní (napr. neschopnosť zavŕtať sa do pôdy, ležanie bez pohybu) a v morfológii (napr. prítomnosť otvorených rán). Všetky dospelé červy sa potom vyberú z testovacích nádob, spočítajú a zvážia. Vyhľadávanie dospelých jedincov môže uľahčiť presun pôdy obsahujúcej červy na čistú podložku pred hodnotením. Červy vybraté z pôdy by sa mali pred vážením umyť (deionizovanou vodou) a prebytočná voda by sa mala odstrániť tak, že sa červy nakrátko umiestnia na filtračný papier. Červy, ktoré sa v danej chvíli nenájdu, sa zaznamenajú ako mŕtve, lebo je možné predpokladať, že takéto červy pred hodnotením uhynuli a rozložili sa.

▼M6

38. Ak bola pôda z nádob odstránená, následne sa vráti späť (bez dospelých červov, ale obsahujúca všetky kokóny, ktoré sa vyprodukovali). Pôda sa potom inkubuje ďalšie štyri týždne za tých istých podmienok testu, s výnimkou toho, že kŕmenie sa vykoná len raz na začiatku tejto fázy testu (pozri bod 33).

39. Na konci druhého 4-týždňového obdobia sa postupmi opísanými v dodatku 5 stanoví počet juvenilných jedincov vyliahnutých z kokónov v testovacej pôde a počet kokónov. Počas celého testu by sa mali tiež zaznamenávať všetky príznaky zranenia alebo poškodenia červov.

Limitný test

40. Ak sa v rámci testu na vyhľadávanie rozsahu nepozorujú žiadne účinky ani pri najvyššej koncentrácii (t. j. 1 000 mg/kg), reprodukčný test sa vykoná ako limitný test s použitím koncentrácie 1 000 mg/kg. Limitný test umožní preukázať, či je hodnota NOEC z hľadiska reprodukcie vyššia ako limitná koncentrácia, a zároveň sa minimalizuje počet červov použitých v rámci testu. Pre vzorky pôdy s aplikovanou chemikáliou aj pre kontrolné vzorky by sa malo použiť osem replikátov.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

41. Hoci v dodatku 6 je uvedený prehľad, žiadne definitívne štatistické usmernenia na analýzu výsledkov testu táto testovacia metóda neposkytuje.

42. Jedným z parametrov je mortalita. Preto by sa mali zaznamenať aj zmeny v správaní (napr. neschopnosť zavŕtať sa do pôdy, ležanie bez pohybu pri sklenej stene testovacej nádoby) a v morfológii (napr. prítomnosť otvorených rán) dospelých jedincov, ako aj existencia každého juvenilného jedinca. Na stanovenie koncentrácie LC_{50} by sa mala spravidla používať probitová analýza (18) alebo logaritmická regresia. V prípadoch, keď je táto metóda analýzy nevhodná (napr. ak sú k dispozícii menej ako tri koncentrácie čiastočne spôsobujúce usmrtenie), je však možné použiť alternatívne metódy. Tieto metódy môžu zahŕňať pohyblivé priemery (19), upravenú Spearman-Karberovu metódu (20) alebo jednoduchú interpoláciu (napr. geometrickú strednú hodnotu LC_0 a LC_{100} vypočítanú ako súčin druhej odmocniny LC_0 a hodnoty LC_{100}).

43. Ďalším parametrom je plodnosť (t. j. počet vyprodukovaných mladých jedincov). Pokiaľ však ide o test na vyhľadávanie rozsahu, všetky ostatné škodlivé príznaky by sa mali uviesť v záverečnej správe. Štatistická analýza si vyžaduje výpočet aritmetickej strednej hodnoty $\bar{x}$ a štandardnej odchýlky vo vzťahu k reprodukcii pre vzorky s aplikovanou chemikáliou a kontrolné vzorky.

44. Ak sa vykonáva analýza rozptylu, štandardnú odchýlku (s) a stupne voľnosti (df) môže nahradiť odhad výberového rozptylu získaný postupom ANOVA a stupne jeho voľnosti za predpokladu, že rozptyl nezávisí od koncentrácie. V tomto prípade sa použije jedna hodnota rozptylu pre kontrolné vzorky a pre vzorky s aplikovanou chemikáliou. Tieto hodnoty sa zvyčajne vypočítajú pomocou komerčného štatistického softvéru s využitím výsledkov pre jednotlivé nádoby ako replikátov. Ak sa spájanie údajov pre negatívne kontrolné vzorky a kontrolné vzorky s rozpúšťadlom zdá byť primeranejšie než porovnávanie s jednou z týchto skupín v rámci testu, malo by sa testovaním zistiť, či nie sú výrazne odlišné (vhodné testy sú uvedené v bode 47 a dodatku 6).

45. Ďalšie štatistické testovanie a odvodzovanie závisí od toho, či majú hodnoty pre replikáty normálne rozdelenie a sú homogénne, pokiaľ ide o ich rozptyl.

▼M6

Odhad koncentrácie NOEC

46. Uprednostniť by sa malo použitie výkonných testov. Mali by sa využívať informácie napríklad z predchádzajúcich skúseností z medzilaboratórnych porovnávacích skúšok, prípadne iné historické údaje o tom, či sú údaje približne normálne rozdelené. Homogénnosť rozptylu (homoskedasticita) je kritickejšia. Zo skúseností vyplýva, že rozptyl sa často zvyšuje s rastúcou strednou hodnotou. V týchto prípadoch by transformácia údajov mohla viesť k homoskedasticite. Taká transformácia by však mala byť založená na skúsenostiach s historickými údajmi, a nie na údajoch, ktoré sú predmetom prešetrovania. S homogénnymi údajmi by sa mali vykonať viaceré t-testy, ako napríklad Williamsov test (α = 0,05, jednostranný) (21) (22), alebo v určitých prípadoch Dunnettov test (23) (24). Je potrebné si uvedomiť, že v prípade nerovnakej replikácie sa tabuľkové t-hodnoty musia upraviť tak, ako navrhujú Dunnett a Williams. Niekedy sa reakcie nezvyšujú/neznižujú pravidelne v dôsledku veľkých odchýlok. V prípade výraznej odchýlky od monotónnosti je Dunnettov test vhodnejší. Ak sa vyskytnú odchýlky od homoskedasticity, môže byť vhodné podrobnejšie preskúmať možné účinky na rozptyly s cieľom rozhodnúť, či sa t-testy môžu použiť bez výraznejšej straty výkonnosti (25). Alternatívne sa môžu použiť viacnásobné U-testy, napríklad Bonferroniho U-test podľa Holma (26), alebo v prípade, keď tieto údaje vykazujú heteroskedasticitu, ale inak sú v súlade so základným monotónnym priebehom krivky závislosti dávka-odpoveď, môže sa použiť iný neparametrický test [napr. Jonckheereho-Terpstrov (27) (28) alebo Shirleyho (29) (30)], pričom vo všeobecnosti sú tieto testy uprednostňované pred t-testami s nerovnakým rozptylom (pozri tiež náčrt v dodatku 6).

47. Ak sa vykonáva limitný test a sú splnené podmienky postupov parametrického testu (normalita, homogenita), môže sa použiť Studentov párový t-test, v opačnom prípade Mannov-Whitneyho postup U-testu (31).

Odhad koncentrácie EC_x

48. Pri výpočte ktorejkoľvek hodnoty EC_x sa na regresnú analýzu (lineárnu alebo nelineárnu) používajú stredné hodnoty pre jednotlivé vzorky s aplikovanou chemikáliou, a to po získaní vhodnej funkcie závislosti dávky a reakcie. Pre rast červov ako nepretržitú reakciu sa hodnoty EC_x môžu odhadnúť použitím vhodnej regresnej analýzy (32). Medzi vhodné funkcie pre kvantálne údaje (mortalita/prežitie) a počet vyprodukovaných potomkov patria bežný sigmoid, logistická alebo Weibullova funkcia s dvomi až štyrmi parametrami, pričom niektoré z týchto funkcií môžu modelovať aj hormetické reakcie. Ak sa lineárnou regresnou analýzou určila funkcia závislosti dávky a reakcie, mal by sa pred odhadom hodnoty EC_x nájsť regresnou analýzou významný koeficient determinácie (r^2) a/alebo sklon zadaním hodnoty zodpovedajúcej x % strednej hodnoty pre kontrolnú vzorku do rovnice získanej regresnou analýzou. Hranice spoľahlivosti 95 % sa vypočítajú podľa Fiellera [citovaný v práci Finneyho (18)] alebo inými modernými vhodnými metódami.

49. Alternatívne sa reakcia modeluje ako percentuálna časť alebo podiel modelového parametra, ktorý sa interpretuje ako stredná hodnota reakcie kontrolnej vzorky. V týchto prípadoch sa výsledky často môžu ľahko znázorniť normálnou (logistickou, Weibullovou) sigmoidnou krivkou s použitím postupu probitovej regresie (18). V týchto prípadoch sa váhová funkcia musí upraviť na metrické reakcie, ako uvádza Christensen (33). Ak sa však pozoruje horméza, probitovú analýzu by mala nahradiť logistická alebo Weibullova funkcia so štyrmi parametrami, určená postupom nelineárnej regresie (34). Ak z údajov nie je možné určiť vhodnú funkciu závislosti dávky a reakcie, môžu sa na odhad hodnoty EC_x a jej hraníc spoľahlivosti použiť alternatívne metódy, ako sú pohyblivé priemery podľa Thompsona (19) a upravený Spearman-Karberov postup (20).

PROTOKOL O SKÚŠKE

50. Protokol o skúške musí obsahovať tieto informácie:

▼**M6**

Testovaná chemikália:

— úplný opis testovanej chemikálie, číslo šarže, číslo dávky a číslo CAS, čistota,

— vlastnosti testovanej chemikálie [napr. log K_{ow}, rozpustnosť vo vode, tlak pary, Henryho konštanta (H) a informácie o jej osude a správaní].

Testované organizmy:

— použité testované živočíchy: druh, vedecký názov, zdroj organizmov a podmienky chovu,

— vek, veľkosť (hmotnosť) testovaných organizmov.

Podmienky testu

— podrobnosti o príprave testovacej pôdy,

— maximálna kapacita zadržiavania vody v pôde,

— opis metódy, ktorá sa použila na aplikáciu testovanej chemikálie do pôdy,

— údaje o pomocných chemikáliách použitých na podávanie testovanej chemikálie,

— kalibračné údaje o rozstrekovacích zariadeniach, ak je to potrebné,

— opis koncepcie experimentu a postupu,

— veľkosť testovacích nádob a objem testovacej pôdy,

— podmienky testu: intenzita svetla, trvanie cyklov svetla a tmy, teplota,

— opis kŕmneho režimu, druh a množstvo potravy, ktorá sa používala v rámci testu, dátumy kŕmenia,

— hodnoty pH a obsahu vody v pôde na začiatku a na konci testu.

Výsledky testu:

— mortalita dospelých jedincov (%) v každej testovacej nádobe na konci prvých 4 týždňov testu,

— celková hmotnosť dospelých jedincov na začiatku testu v každej testovacej nádobe,

— zmeny telesnej hmotnosti živých dospelých jedincov (% počiatočnej hmotnosti) v každej testovacej nádobe po prvých štyroch týždňoch testu,

— počet juvenilných jedincov vyprodukovaných v každej testovacej nádobe na konci testu,

— opis zjavných alebo patologických príznakov alebo výrazných zmien v správaní,

— výsledky získané s referenčnými vzorkami testovanej chemikálie,

— hodnoty LC_{50}, NOEC a/alebo EC_x (napr. EC_{50}, EC_{10}) pre reprodukciu, ak sú niektoré z nich použiteľné, spolu s intervalmi spoľahlivosti a grafom, ktorý znázorňuje model ich výpočtu, ako aj všetky informácie a pozorovania, ktoré môžu byť nápomocné pri interpretácii výsledkov,

— diagram vzťahu dávky a účinku,

— výsledky uplatniteľné na každú testovaciu nádobu.

Uvedú sa odchýlky od postupov opísaných v tejto testovacej metóde a všetky nezvyčajné udalosti počas testu.

LITERATÚRA

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. Chapter C.8 of this Annex, Earthworm acute toxicity test.

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

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov

Na účely tejto testovacej metódy sa používajú tieto vymedzenia pojmov:

Chemikália je látka alebo zmes.

EC_x (účinná koncentrácia x %) je koncentrácia, ktorá v rámci stanoveného času expozície vyvolá účinok x % na testované organizmy v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Napríklad EC_{50} je koncentrácia, pri ktorej sa odhaduje, že v stanovenom čase expozície vyvolá účinok na výsledok testu pri 50 % exponovanej populácie. V rámci tohto testu sa účinné koncentrácie vyjadrujú ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovacej pôdy alebo ako hmotnosť testovanej chemikálie na jednotku plochy pôdy.

LC_0 (nulová letálna koncentrácia) je koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá v danom časovom úseku nespôsobí usmrtenie testovaných organizmov vystavených jej pôsobeniu. V rámci tohto testu sa LC_0 vyjadruje ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovanej pôdy.

LC_{50} (stredná letálna koncentrácia) je koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá v danom časovom úseku spôsobí usmrtenie 50 % testovaných organizmov vystavených jej pôsobeniu. V rámci tohto testu sa LC50 vyjadruje ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovacej pôdy alebo ako hmotnosť testovanej chemikálie na jednotku plochy pôdy.

LC_{100} (absolútna letálna koncentrácia) je koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá v danom časovom úseku spôsobí usmrtenie 100 % testovaných organizmov vystavených jej pôsobeniu. V rámci tohto testu sa LC_{100} vyjadruje ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovanej pôdy.

LOEC (najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom) je najnižšia koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá má štatisticky významný účinok ($p < 0,05$). V rámci tohto testu sa LOEC vyjadruje ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovacej pôdy alebo ako hmotnosť testovanej chemikálie na jednotku plochy pôdy. Všetky testovacie koncentrácie vyššie ako LOEC by za normálnych okolností mali vyvolať účinok, ktorý je štatisticky odlišný od kontrolných vzoriek. Akékoľvek odchýlky od uvedeného musia byť odôvodnené v správe o teste.

NOEC (koncentrácia bez pozorovaného účinku) je najvyššia koncentrácia testovanej chemikálie, bezprostredne pod koncentráciou LOEC, pri ktorej sa nepozoruje žiadny účinok. V tomto teste koncentrácia zodpovedajúca hodnote NOEC nemá žiadny štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) v rámci daného expozičného času v porovnaní s kontrolnou vzorkou.

Miera reprodukcie je stredná hodnota počtu narodených juvenilných červov na počet dospelých červov počas testu.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

▼M6

Dodatok 2

Stanovenie kapacity zadržiavania vody umelej pôdy

Táto metóda sa považuje za vhodnú. Opísaná je v prílohe C normy ISO DIS 11268-2.

Pomocou vhodného zariadenia (špirálová trubica atď.) sa odoberie určené množstvo (napr. 5 g) testovacieho pôdneho substrátu. Spodná časť trubice sa zakryje kúskom filtračného papiera a po naplnení vodou sa umiestni na stojan vo vodnom kúpeli. Trubica by sa mala postupne ponárať do vody, až kým vodná hladina nestúpne nad vrchnú vrstvu pôdy. Potom by sa mala nechať vo vode približne tri hodiny. Keďže nie všetka voda, ktorú absorbujú kapiláry pôdy, sa môže zachovať, vzorke pôdy by sa malo umožniť odvodnenie počas dvoch hodín tak, že sa trubica uloží na vrstvu veľmi mokrého jemne drveného kremenného piesku v uzavretej nádobe (aby sa zabránilo vysúšaniu). Vzorka by sa potom mala odvážiť a vysušiť na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C. Kapacitu zadržiavania vody (WHC) je možné vypočítať takto:

$$\text{WHC (v \% suchej hmotnosti)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

kde:

S = vodou saturovaný substrát + hmotnosť trubice + hmotnosť filtračného papiera,

T = hmotnosť obalu (hmotnosť trubice + hmotnosť filtračného papiera),

D = suchá hmotnosť substrátu.

LITERATÚRA:

1. 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**

Dodatok 3

Stanovenie pH pôdy

Táto metóda stanovenia pH pôdy je založená na opise uvedenom v norme ISO DIS 10390: Kvalita pôdy – stanovenie pH (1).

Určené množstvo pôdy sa suší pri teplote miestnosti najmenej 12 hodín. Potom sa vytvorí suspenzia pôdy (obsahujúca najmenej 5 g pôdy) s päťnásobným objemom 1 M roztoku chloridu draselného (KCl) analytickej čistoty alebo 0,01 M roztoku chloridu vápenatého ($CaCl_2$) analytickej čistoty. Suspenzia sa následne päť minút dôkladne pretrepáva a potom sa nechá stáť najmenej 2 hodiny, ale nie dlhšie ako 24 hodín. Hodnota pH kvapalnej fázy sa potom meria pH metrom, ktorý sa pred každým meraním kalibruje pomocou vhodnej série tlmivých roztokov (napr. s pH 4,0 a 7,0).

LITERATÚRA:

(1) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼M6

Dodatok 4

Kultivácia druhov *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*

Chov by mal prednostne prebiehať v klimatickej komore pri teplote 20 °C ± 2 °C. Pri tejto teplote a zabezpečení dostatku potravy červy dospejú približne po dvoch až troch mesiacoch.

Oba druhy je možné kultivovať v širokej škále živočíšnych odpadov. Odporúčané chovné médium je zmes konského alebo kravského hnoja a rašeliny v pomere 50: 50. Kontroly by mali zabezpečiť, že kravy alebo kone, od ktorých sa hnoj získava, nepodstupujú liečbu alebo ošetrovanie chemickými látkami, ako sú rastové stimulátory, nematicídy alebo podobné veterinárne produkty, ktoré by mohli mať počas testu nepriaznivý vplyv na červy. Odporúča sa hnoj získaný z „organických“ zdrojov, lebo zo skúseností vyplynulo, že komerčne dostupný hnoj, používaný ako záhradné hnojivo, môže mať nepriaznivé účinky na červy. Médium by malo mať hodnotu pH približne 6 – 7 (upravenú pomocou uhličitanu vápenatého), nízku iónovú vodivosť (menej ako 6 mS/cm alebo 0,5 % koncentrácie soli) a nemalo by byť nadmerne kontaminované amoniakom alebo živočíšnym močom. Substrát by mal byť vlhký, ale nie príliš mokrý. Vhodné sú chovné nádoby s objemom 10 – 50 litrov.

Na získanie červov štandardného veku a veľkosti (hmotnosti) je najlepšie začať kultiváciou kokónov. Kultúra sa po vytvorení udržiava umiestnením dospelých červov do chovnej nádoby s čerstvým substrátom na 14 až 28 dní s cieľom umožniť produkciu ďalších kokónov. Dospelé jedince sa potom premiestnia a juvenilné jedince vyliahnuté z kokónov sa použijú ako základ pre ďalšiu kultúru. Červy sa kŕmia nepretržite živočíšnym odpadom a z času na čas sa presúvajú do čerstvého substrátu. Zo skúseností vyplynulo, že vhodnou potravou je vzduchom sušený, jemne mletý kravský alebo konský hnoj alebo ovsená múka. Je potrebné zabezpečiť, aby kravy alebo kone, od ktorých sa hnoj získava, neboli liečené chemickými látkami, ako sú rastové stimulátory, ktoré by mohli mať negatívny vplyv na červy počas dlhodobej kultivácie. Červy vyliahnuté z kokónov sa používajú na testovanie, keď majú 2 – 12 mesiacov a považujú sa za dospelé jedince.

Červy je možné považovať za zdravé, ak sa pohybujú v substráte, nesnažia sa opustiť substrát a priebežne sa rozmnožujú. Vyčerpanie substrátu sa prejavuje tým, že červy sa pohybujú veľmi pomaly a zadnú časť tela majú žltú. V tomto prípade sa odporúča zabezpečiť čerstvý substrát a/alebo znížiť hustotu chovu.

▼M6

Dodatok 5

Techniky na počítanie juvenilných červov vyliahnutých z kokónov

Ručné triedenie červov v pôdnom substráte je veľmi časovo náročné. Preto sa odporúčajú dve alternatívne metódy:

a) Testovacie nádoby sa umiestnia do vodného kúpeľa s počiatočnou teplotou 40 °C, ktorá sa však zvýši na 60 °C. Po približne 20 minútach by sa na povrchu pôdy mali objaviť juvenilné červy, odkiaľ je možné ich ľahko vybrať a spočítať.

b) Testovacia pôda sa môže premyť cez sito pomocou metódy, ktorú vypracovali van Gestel a kol. (1), za predpokladu, že rašelina a hnoj alebo ovsená múka, pridávané do pôdy, boli pomleté na jemný prášok. Dve sitá s veľkosťou ôk 0,5 mm (priemer 30 cm) sa uložia na seba. Obsah skúšobnej nádoby sa premyje cez sitá silným prúdom vody z vodovodu, pričom juvenilné červy a kokóny sa zachytia prevažne na vrchnom site. Je dôležité si uvedomiť, že celý povrch vrchného sita by mal počas tejto operácie zostať mokrý, aby sa mladé červy vznášali na vrstve vody, a tak sa im zabránilo v preliezaní okami sita. Najlepšie výsledky sa dosahujú, ak sa používa sprchová hlavica.

Keď sa všetok pôdny substrát premyje cez sitá, juvenilné jedince a kokóny sa môžu spláchnuť z vrchného sita do misy. Obsah misy sa potom nechá odstáť, pričom prázdne kokóny vyplávajú na hladinu vody a plné kokóny a mladé červy sa potopia na dno. Odstáta voda sa potom môže vyliať a mladé červy a kokóny sa presunú do Petriho misky s malým množstvom vody. Červy je možné povyberať na počítanie pomocou ihly alebo pinzety.

Zo skúseností vyplynulo, že metóda a) je vhodnejšia na vyberanie juvenilných červov, ktoré sa môžu spláchnuť aj cez sito s veľkosťou ôk 0,5 mm.

Zakaždým by sa mala stanoviť účinnosť metódy použitej na vyberanie červov (a prípadne kokónov) z pôdneho substrátu. Ak sa juvenilné jedince vyberajú technikou ručného triedenia, odporúča sa vykonať túto operáciu dvakrát na všetkých vzorkách.

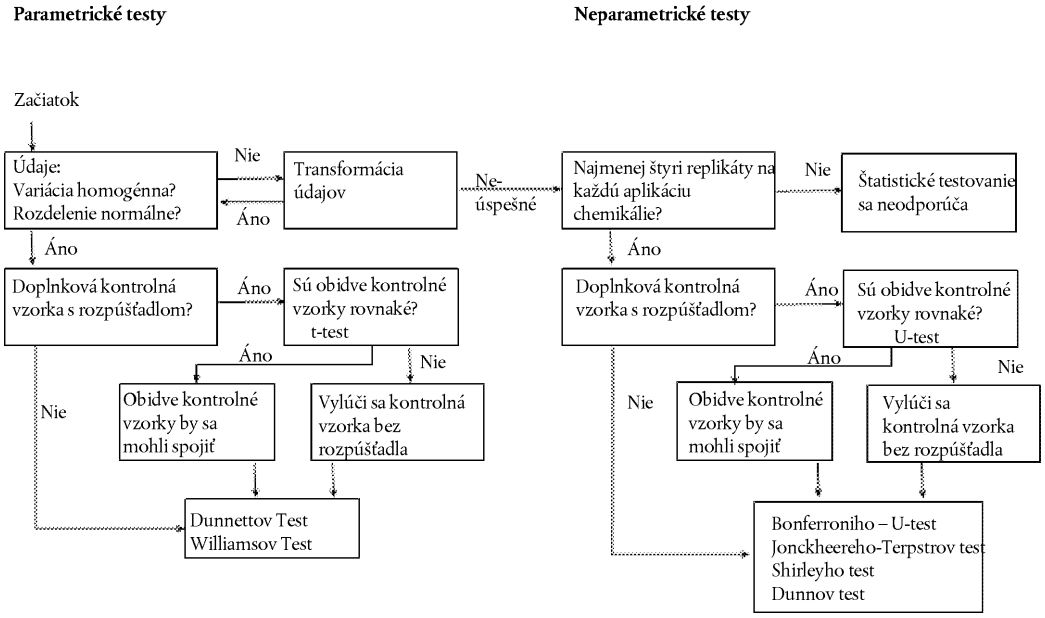
LITERATÚRA:

(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**

Dodatok 6

Prehľad štatistického posúdenia údajov (stanovenie hodnoty NOEC)



▼M6

C.34. STANOVENIE INHIBÍCIE ČINNOSTI ANAERÓBNYCH BAKTÉRIÍ – ZNÍŽENIE PRODUKCIE PLYNU Z ANAERÓBNE VYHNÍVAJÚCEHO (ČISTIARENSKÉHO) KALU

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 224 (2007). Chemikálie vypúšťané do vodného prostredia prechádzajú aeróbnymi aj anaeróbnymi zónami, kde môžu degradovať a/alebo inhibovať činnosť baktérií. V niektorých prípadoch môžu nerušene zostať v anaeróbnych zónach celé desaťročia alebo aj dlhšie. Pri čistení odpadových vôd je prvá fáza – primárne usadzovanie – v kvapalnom supernatante aeróbne a v kalovom subnatante anaeróbne. Ďalej sa v druhej fáze aeróbna zóna nachádza v aktivovanom kale v prevzdušňovacej nádrži a anaeróbna zóna v kalovom subnatante v sekundárnej usadzovacej nádrži. Kal z obidvoch týchto fáz zvyčajne prechádza anaeróbnou úpravou, pričom vzniká metán a oxid uhličitý, ktoré sa spravidla používajú na výrobu elektrickej energie. V širšom prostredí chemikálie prenikajúce do sedimentov v zálivoch, ústiach riek a v mori pravdepodobne zostanú v týchto anaeróbnych zónach natrvalo, ak nie sú biodegradovateľné. Určité chemikálie preniknú do týchto zón vo väčšom množstve najmä vďaka svojim fyzikálnym vlastnostiam, ako je nízka rozpustnosť vo vode, vysoká adsorpcia na suspendované tuhé látky, ako aj neschopnosť aeróbnej biodegradácie.

2. Je žiaduce, aby chemické látky vypúšťané do životného prostredia boli biodegradovateľné v aeróbnych aj anaeróbnych podmienkach, zároveň je však potrebné, aby takéto chemikálie neinhibovali činnosť mikroorganizmov v žiadnej z uvedených zón. V Spojenom kráľovstve sa vyskytlo niekoľko prípadov úplnej inhibície tvorby metánu, spôsobenej napríklad pentachlórfenolom vo vypúšťaných priemyselných odpadových vodách, čo viedlo k veľmi nákladnej preprave inhibovaného kalu z vyhnívacích nádrží na „bezpečné“ skládky a dovozu zdravo vyhnívajúceho kalu zo susedných zariadení. Vyskytli sa však mnohé prípady menej závažného narušenia vyhnívania viacerými ďalšími chemikáliami vrátane alifatických halogénovaných uhľovodíkov (chemické čistenie) a detergentov, čo viedlo k výraznému zníženiu účinnosti vyhnívacej nádrže.

3. Iba jedna testovacia metóda, C.11 (1), sa zaoberá inhibíciou činnosti baktérií (respirácia aktivovaného kalu), keď posudzuje účinok testovanej látky na mieru spotreby kyslíka v prítomnosti substrátu. Metóda sa vo veľkej miere využíva na včasné varovanie pred možnými škodlivými účinkami chemikálií na aeróbnu úpravu odpadových vôd, ako aj pri určovaní neinhibičných koncentrácií testovaných chemikálií, ktoré sa majú používať v rôznych testoch biodegradovateľnosti. Testovacia metóda C.43 (2) poskytuje obmedzené možnosti na stanovenie toxicity testovanej chemikálie pre produkciu plynu v anaeróbnom kale, zriedenom na jednu desatinu bežnej koncentrácie tuhých látok s cieľom umožniť požadovanú presnosť pri posudzovaní percentuálnej hodnoty biodegradácie. Keďže zriedený kal by mohol byť citlivejší na inhibičné chemikálie, skupina ISO sa rozhodla vypracovať metódu, pri ktorej sa používa nezriedený kal. Preskúmali sa najmenej tri texty (z Dánska, Nemecka a Spojeného kráľovstva) a nakoniec boli vypracované dve normy ISO, jedna s použitím nezriedeného kalu – ISO 13 641-1 (3) a druhá s použitím kalu zriedeného na jednu stotinu – ISO 13 641-2 (4), ktoré predstavujú kaly a sedimenty s malým množstvom bakteriálnych kultúr. Obe metódy boli podrobené medzilaboratórnej porovnávacej skúške (5): časť 1 bola potvrdená ako prijateľná norma, no časť 2 vyvolala nesúhlas. Zástupcovia Spojeného kráľovstva sa domnievali, že metóda si vyžaduje ďalšie preskúmanie, keďže veľká časť účastníkov uvádzala veľmi nízku alebo žiadnu produkciu plynu, čiastočne z toho dôvodu, že podiel priestoru pre plyn bol príliš vysoký (75 %) na optimálnu citlivosť.

4. V starších prácach uverejnených v Spojenom kráľovstve (6) (7) bola opísaná manometrická metóda, pri ktorej sa používal nezriedený vyhnívajúci kal a surový čistiarenský kal ako substrát v 500 ml bankách. Zariadenie bolo neskladné a zápach surového kalu nepríjemný. Neskôr Wilson a kol. (10) úspešne používali kompaktnejšie a vhodnejšie prístroje Sheltona a Tiedjeho (8), ktoré zdokonalili Battersby a Wilson (9). Kawahara a kol. (11)

▼M6

v laboratóriu úspešne pripravili štandardnejšie kaly na použitie v rámci testov anaeróbnej biodegradovateľnosti a inhibície pre množstvo chemikálií. Okrem toho bol surový kal ako substrát nahradený a test sa vykonáva s použitím anaeróbneho kalu zriedeného na jednu stotinu alebo s kalmi, sedimentmi atď. s malou bakteriálnou činnosťou.

5. Táto metóda môže poskytnúť informácie, ktoré sú užitočné pri predpovedaní pravdepodobného účinku testovanej chemikálie na produkciu plynu v anaeróbnych vyhnívacích nádržiach. Iba dlhšie testy, ktoré dôslednejšie simulujú fungujúce vyhnívacie nádrže, však môžu ukázať, či môže dôjsť k adaptácii mikroorganizmov na testovanú chemikáliu, alebo či chemikálie, ktoré pravdepodobne kal absorbuje alebo adsorbuje, môžu vytvoriť toxickú koncentráciu na dlhšie obdobie, než umožňuje tento test.

PRINCÍP TESTU

6. Alikvotné časti zmesi anaeróbne vyhnívajúceho kalu (20 – 40 g/l celkových tuhých látok) a degradovateľného substrátového roztoku sa inkubujú samostatne a súčasne s rôznymi koncentráciami testovanej chemikálie v utesnených nádobách najviac tri dni. Množstvo vyprodukovaného plynu (metán a oxid uhličitý) sa zisťuje meraním nárastu tlaku (v Pa) vo fľašiach. Percentuálna hodnota inhibície produkcie plynu v dôsledku rôznych koncentrácií testovanej chemikálie sa vypočíta na základe množstiev vyprodukovaných v príslušných testovacích a kontrolných fľašiach. Hodnota EC_{50} a iné účinné koncentrácie sa vypočítajú z diagramov závislosti percentuálnej inhibície od koncentrácie testovaných chemikálií, alebo, čo je zvyčajnejšie, jej logaritmu.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

7. Testované chemikálie by sa mali spravidla používať v najčistejšej bežne dostupnej forme, keďže nečistoty v niektorých chemikáliách, napríklad v chlórfenoloch, môžu byť oveľa toxickejšie než samotná testovaná chemikália. Je však potrebné tiež zvážiť potrebu, aby sa chemikálie testovali vo forme, v ktorej sa vyrábajú/komerčne sprístupňujú. Použitie pripravených výrobkov sa bežne neodporúča, ale v prípade slabo rozpustných testovaných látok môže byť použitie pripraveného materiálu vhodné. Vlastnosti testovanej chemikálie, ktoré by mali byť k dispozícii, zahŕňajú rozpustnosť vo vode a v niektorých organických rozpúšťadlách, tlak pary, adsorpčný koeficient, hydrolýzu a biodegradovateľnosť v anaeróbnych podmienkach.

POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

8. Tento test je možné použiť na chemikálie, ktoré sú rozpustné alebo nerozpustné vo vode vrátane prchavých chemikálií. Osobitnú pozornosť je však potrebné venovať materiálom s nízkou rozpustnosťou vo vode [pozri literatúru (12)] a vysokou prchavosťou. Použiť sa môžu aj inokulá z anaeróbnych miest, ako sú napríklad kaly, nasýtené pôdy, sedimenty. Anaeróbne bakteriálne systémy, ktoré už boli vystavené pôsobeniu toxických chemikálií, môžu byť prispôsobené na zachovanie svojej činnosti v prítomnosti xenobiotických chemikálií. Inokulá z prispôsobených bakteriálnych systémov môžu prejavovať vyššiu toleranciu voči testovaným chemikáliám v porovnaní s inokulami získanými z neprispôsobených systémov.

REFERENČNÉ CHEMIKÁLIE

9. S cieľom kontrolovať postup sa testuje referenčná chemikália vo vhodných nádobách, paralelne, ako súčasť bežného testu. Ako konzistentný inhibítor produkcie anaeróbneho plynu, ako aj spotreby kyslíka aktivovaným kalom a iných biochemických reakcií sa ukázal 3,5-dichlórfenol. Dve ďalšie chemikálie sa ukázali byť viac inhibujúce vo vzťahu k metánu než 3,5-dichlórfenol, konkrétne metylén bis(tiokyanát) a pentachlórfenol, ale výsledky s nimi neboli validované. Pentachlórfenol sa neodporúča, lebo nie je ľahko dostupný v čistej forme.

▼M6

REPRODUKOVATEĽNOSŤ VÝSLEDKOV

10. V medzinárodnej porovnávacej skúške (5) sa medzi desiatimi zúčastnenými laboratóriami ukázala ako dostatočná iba reprodukovateľnosť hodnôt EC_{50} pre 3,5-dichlórfenol a kyselinu 2-brómetán-sulfónovú. (Rozsah pre 3,5-dichlórfenol bol 32 – 502 mg/l a pre kyselinu 2-brómetán-sulfónovú 220 – 2 190 mg/l).

Počet laboratórií	mg/l			mg/g kalu		
	stredná hodnota	s.d.	cv(%)	stredná hodnota	s.d.	cv(%)
	3,5-dichlórfenol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	kyselina 2-brómetán-sulfónová					
10	1 058	896	85	34	26	76

Údaje EC_{50} z medzilaboratórnej porovnávacej skúšky – neriedený kal

11. Vysoké variačné koeficienty medzi laboratóriami do veľkej miery odrážajú rozdiely v citlivosti mikroorganizmov v kale spôsobené skutočnosťou, že v minulosti buď boli vystavené, alebo neboli vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie alebo iných chemicky príbuzných chemikálií. Presnosť, s akou sa stanovila hodnota EC_{50} na základe koncentrácie kalu, bola sotva vyššia než v prípade hodnoty stanovenej na základe objemu (mg/l). Tri laboratóriá, ktoré uviedli presnosť svojich hodnôt EC_{50} pre 3,5-dichlórfenol, vykázali oveľa nižšie variačné koeficienty (22, 9 a 18 % pre EC_{50} v mg/g), než boli variačné koeficienty stredných hodnôt všetkých desiatich laboratórií. Jednotlivé stredné hodnoty pre tri laboratóriá boli 3,1, 3,2 a 2,8 mg/g. Nižšie, prijateľné variačné koeficienty v rámci jednotlivých laboratórií v porovnaní s oveľa vyššími koeficientmi medzi rôznymi laboratóriami, t. j. 9 – 22 %, resp. 92 %, naznačujú, že existujú výrazné rozdiely vo vlastnostiach jednotlivých kalov.

OPIS METÓDY

Zariadenie

12. Potrebné je bežné laboratórne vybavenie a tieto zariadenia:

a) inkubátor – odolný proti iskrám a s udržiavanou teplotou 35 °C ± 2 °C;

b) tlaku odolné sklené testovacie nádoby primeraných menovitých rozmerov ([1]), z ktorých každá je vybavená plynotesnými poťahovanými priehradkami, schopnými odolávať tlaku približne 2 bary alebo 2×10^5 Pa (ako poťah sa používa napríklad PTFE = polytetrafluóretylén). Odporúčajú sa sklené fľaše na sérum s menovitým objemom 125 ml, so skutočným objemom približne 160 ml, utesnené sérovou priehradkou ([2]) a drážkovanými hliníkovými prstencami. Vhodné sú však aj fľaše s celkovým objemom 0,1 – 1 liter;

([1]) Odporúčaná veľkosť je 0,1 litra až 1 liter.

([2]) Odporúča sa používať plynotesné silikónové priehradky. Ďalej sa odporúča, aby sa tesnosť uzáverov, predovšetkým butylkaučukových priehradiek, testovala, lebo viaceré komerčne dostupné priehradky nie sú dostatočne plynotesné proti metánu a niektoré priehradky strácajú tesnosť, keď sa prepichnú ihlou podľa podmienok testu.

— Plynotesné poťahované priehradky sa odporúčajú a používať sa musia v prípade prchavých chemikálií (niektoré komerčné priehradky sú pomerne tenké, menej ako 0,5 cm, a nezostávajú plynotesné po prepichnutí injekčnou ihlou).

— Butylkaučukové priehradky (približne 1 cm) sa odporúčajú, ak testované látky nie sú prchavé (po prepichnutí spravidla zostávajú plynotesné).

— Pred testom sa odporúča dôkladne preskúmať priehradky, či sú schopné zostať po prepichnutí plynotesné.

▼M6

c) presný tlakomer ([1]) a ihlový nástavec;

celková produkcia plynu (metán a oxid uhličitý) sa meria pomocou tlakomera prispôsobeného na meranie a odvádzanie vyprodukovaného plynu. Príkladom vhodného prístroja je ručný presný tlakomer s pripojenou injekčnou ihlou a trojcestným plynotesným ventilom, ktorý umožňuje uvoľnenie nadmerného tlaku (dodatok 1). Vnútorný objem rúrky a ventilu snímača tlaku by mal byť čo najmenší, aby boli chyby, ktoré vznikajú zanedbaním objemu zariadenia, zanedbateľné;

d) izolované nádoby na prepravu vyhnívajúceho kalu;

e) trojcestné tlakové ventily;

f) sito so štvorcovými okami so stranou 1 mm;

g) zásobník na vyhnívajúci kal – fľaša zo skla alebo z polyetylénu s vysokou hustotou, s objemom približne 5 litrov, vybavená miešadlom a zariadením na prúdenie plynného dusíka (pozri bod 13) cez voľný priestor nad kalom;

h) membránové filtre (0,2 μm) na sterilizáciu substrátu;

i) mikrostriekačky na plynotesné pripojenie snímača tlaku [pozri bod 12 c)] k voľnému priestoru vo fľašiach [pozri bod 12 b)] a tiež na pridávanie nerozpustných kvapalných testovacích materiálov do fliaš;

j) odkladacia schránka, nepovinná, ale odporúčaná, s mierne pozitívnym tlakom dusíka.

Reagenty

13. Používajú sa výlučne reagenty analytickej čistoty. Vždy by sa mal používať plynný dusík vysokej čistoty s obsahom menej ako 5 μl/l kyslíka.

Voda

14. Ak je v ktoromkoľvek štádiu potrebné zriedenie, používa sa deionizovaná, vopred odvzdušnená voda. Analytické kontroly tejto vody nie sú potrebné, ale treba zabezpečiť, aby sa pravidelne vykonávala údržba deionizačného prístroja. Deionizovaná voda sa používa aj na prípravu zásobných roztokov. Pred pridaním anaeróbneho inokula do akéhokoľvek roztoku alebo pred zriedením testovaného materiálu je potrebné sa ubezpečiť, že neobsahujú kyslík. To sa vykoná buď vháňaním plynného dusíka do vody (alebo do roztokov) počas 1 hodiny pred pridaním inokula, alebo prípadne zahriatím vody na teplotu varu a ochladením na teplotu miestnosti v atmosfére bez obsahu kyslíka.

Vyhnívajúci kal

15. Vyhnívajúci kal sa aktívne zbiera z vyhnívacích nádrží v čistiarňach odpadových vôd, alebo alternatívne z laboratórnych vyhnívacích nádrží, kde sa spracováva kal prevažne z odpadových vôd z domácností. Praktické informácie týkajúce sa kalu z laboratórnych vyhnívacích nádrží je možné nájsť v literatúre pod číslom (11). Ak sa má používať upravené inokulum, je možné uvažovať o vyhnívajúcom kale z čistiarní priemyselných odpadových vôd. Na zbieranie kalu by sa mali používať fľaše so širokým hrdlom

([1]) Merač by sa mal používať a kalibrovať v pravidelných intervaloch podľa pokynov výrobcu. Ak sa používa tlakomer predpísanej kvality, napríklad opuzdrený oceľovou membránou, nie je potrebná žiadna kalibrácia v laboratóriu. Kalibrovať by ho mala oprávnená inštitúcia v odporúčaných intervaloch. Presnosť kalibrácie je možné skontrolovať v laboratóriu jednobodovým meraním pri tlaku 1×10^5 Pa proti tlakomeru s mechanickým displejom. Ak sa tento bod meria správne, lineárnosť bude tiež nezmenená. Ak sa používajú iné meracie prístroje (bez certifikovanej kalibrácie výrobcom), odporúča sa prepočítanie v celom rozsahu v pravidelných intervaloch (dodatok 2).

▼M6

vyrobené z polyetylénu s vysokou hustotou alebo podobného materiálu, ktorý môže expandovať. Kal sa naloží do fliaš na vzorky až do výšky 1 cm od vrchu fľaše, fľaše sa pevne uzavrú, najlepšie bezpečnostným ventilom [bod 12 písm. e)], a uložia sa do izolovaných nádob [bod 12 písm. d)], aby sa minimalizoval teplotný šok, až kým sa nepremiestnia do inkubátora s udržiavanou teplotou 35 °C ± 2 °C. Pri otváraní fliaš je potrebné zabezpečiť uvoľnenie nadmerného tlaku plynu buď opatrným otvorením uzáveru, alebo pomocou trojcestného ventilu na uvoľňovanie tlaku [bod 12 písm. e)]. Kal by sa mal prednostne použiť do niekoľkých hodín od odberu, inak je potrebné ho uskladniť pri teplote 35 °C ± 2 °C pod vrstvou dusíka najviac na tri dni, kým spravidla dochádza k malým stratám činnosti.

Upozornenie – Vyhnívajúci kal vytvára horľavé plyny, ktoré predstavujú riziko vzniku požiaru a výbuchu a obsahuje aj potenciálne patogénne organizmy. Preto je potrebné pri manipulácii s kalom prijať primerané opatrenia. Z bezpečnostných dôvodov sa na zber kalu nepoužívajú sklené nádoby.

Inokulum

16. Bezprostredne pred použitím sa kal jemne premieša a preleje cez sito s rozmermi ôk 1 mm^2 [bod 12 písm. f)] do vhodnej fľaše [bod 12 písm. g)] cez priestor, ktorým prechádza prúd dusíka. Vytvorí sa vzorka na meranie koncentrácie celkovej sušiny [pozri napríklad normu ISO 11 923 (13) alebo rovnocennú normu EÚ]. Vo všeobecnosti sa kal používa bez riedenia. Koncentrácia tuhých látok je zvyčajne 2 – 4 hm. %. Skontrolujú sa hodnoty pH kalu a v prípade potreby sa upravia na hodnotu 7 ± 0,5.

Testovací substrát

17. V deionizovanej vode sa rozpustí 10 g živín (napr. Oxoid), 10 g kvasnicového extraktu a 10 g D-glukózy a zriedi sa na 100 ml. Substrát sa sterilizuje filtráciou cez membránový filter 0,2 μm [bod 12 písm. h)] a okamžite sa použije, alebo sa uskladní pri teplote 4 °C najviac na jeden deň.

Testovaná chemikália

18. Pripraví sa samostatný zásobný roztok pre každú testovanú chemikáliu rozpustnú vo vode, ktorý obsahuje napríklad 10 g/l chemikálie vo vode bez kyslíka (bod 14). Vhodné objemy týchto zásobných roztokov sa použijú pri príprave reakčných zmesí obsahujúcich odstupňované koncentrácie. Alternatívne sa pripraví séria zriedení každého zásobného roztoku tak, aby bol objem pridaný do testovacích fliaš rovnaký pre každú požadovanú konečnú koncentráciu. Hodnota pH zásobných roztokov by sa mala v prípade potreby upraviť na 7 ± 0,2.

19. Informácie týkajúce sa testovaných chemikálií, ktoré sú nedostatočne rozpustné vo vode, sú uvedené v norme ISO 10 634 (12) alebo rovnocennej norme EÚ. Ak je potrebné použiť organické rozpúšťadlo, treba sa vyhnúť rozpúšťadlám, ako je chloroform a chlorid uhličitý, ktoré sú známe ako silné inhibítory produkcie metánu. Pripraví sa roztok príslušnej koncentrácie chemikálie nerozpustnej vo vode vo vhodnom prchavom rozpúšťadle, napríklad v acetóne alebo dietyléteri. Do prázdnych testovacích fliaš sa nalejú potrebné objemy roztoku s rozpúšťadlom [bod 12 písm. b)] a pred pridaním kalu sa rozpúšťadlo odparí. V prípade iných foriem aplikácie chemikálie sa treba riadiť normou ISO 10 634 (12) alebo rovnocennou normou EÚ, ale je potrebné si uvedomiť, že všetky povrchovo aktívne látky používané na prípravu emulzií môžu byť inhibítormi anaeróbnej produkcie plynu. Ak sa predpokladá, že prítomnosť organických rozpúšťadiel a emulgačných činidiel spôsobuje vznik artefaktov, testovanú chemikáliu je možné pridať priamo do testovacej zmesi vo forme prášku alebo tekutiny. Prchavé chemikálie a vo vode nerozpustné kvapalné testované chemikálie sa môžu vstreknúť do sérových fliaš s inokulom mikrostriekačkou [bod 12 písm. i)].

▼M6

20. Testované chemikálie sa pridávajú do fliaš tak, aby vznikol geometrický rad koncentrácií, napríklad 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l a 15,6 mg/l. Ak rozsah toxicity nie je známy z údajov o podobných látkach, najskôr sa vykoná predbežná skúška na vyhľadávanie rozsahu s koncentráciou 1 000 mg/l, 100 mg/l a 10 mg/l s cieľom stanoviť primeraný rozsah.

Referenčná chemikália

21. Vodný roztok 3,5-dichlórfenolu (10 g/l) sa pripraví postupným pridávaním minimálneho množstva 5 mol/l roztoku hydroxidu sodného k pevnej látke a pretrepávaním až do rozpustenia. Potom sa riedi odkysličenou vodou (bod 14) až do požadovaného objemu, pričom rozpúšťaniu môže pomôcť použitie ultrazvuku. Použiť sa môžu aj iné referenčné chemikálie, ak sa dosiahol priemerný rozsah koncentrácie EC_{50} v rámci najmenej troch testov s rôznymi inokulami (rôzne zdroje alebo rôzne časy odberu).

INTERFERENCIA/CHYBY

22. Niektoré zložky kalov by pravdepodobne mohli reagovať s potenciálnymi inhibítormi a zabrániť ich prístupu k mikroorganizom, a tým znížiť alebo znemožniť inhibíciu. Aj v prípade, že kal už obsahuje chemikáliu, ktorá je inhibičná, môže sa dospieť k chybným výsledkom, ak bola daná chemikália podrobená testu. Okrem uvedených možností existuje viacero identifikovaných faktorov, ktoré môžu viesť k nesprávnym výsledkom. Tie sú uvedené v dodatku 3 spolu s metódami eliminovania alebo aspoň zredukovania chýb.

POSTUP SKÚŠKY

23. Počet potrebných replikátov závisí od stupňa presnosti požadovaného pre indexy inhibície. Ak sú uzávery fliaš počas trvania testu dostatočne plynotesné, pripraví sa len jedna séria (najmenej troch) testovacích fliaš na každú požadovanú koncentráciu. Podobne sa pripraví len jedna séria fliaš s referenčnou chemikáliou a jeden súbor kontrolných vzoriek. Ak je však tesnosť uzáverov fliaš spoľahlivá iba pre jedno alebo niekoľko prepichnutí, je potrebné pripraviť sériu (napr. troch) testovacích fliaš pre každý interval (t), pre ktorý sa požadujú výsledky pre všetky koncentrácie testovanej chemikálie, ktoré sa majú testovať. Podobne sa pripravia série „t“ fliaš pre referenčné chemikálie a pre kontrolné vzorky.

24. Odporúča sa používať odkladaciu schránku [bod 12 písm. j)]. Najmenej 30 minút pred začiatkom testu treba spustiť prietok plynného dusíka cez odkladaciu schránku obsahujúcu celé potrebné vybavenie. Je potrebné zabezpečiť, aby počas manipulácie s fľašami a ich uzatváraní teplota kalu dosahovala hodnotu 35 °C ± 2 °C.

Predbežná skúška

25. Ak činnosť kalu nie je známa, odporúča sa vykonať predbežnú skúšku. Pripravia sa kontrolné vzorky, napríklad s koncentráciou tuhých látok 10 g/l, 20 g/l a 40 g/l a so substrátom, ale bez testovanej chemikálie. Používajú sa tiež rozdielne objemy reakčnej zmesi s cieľom dosiahnuť tri alebo štyri hodnoty pomeru objemu uzavretého priestoru nad kvapalinou k objemu kvapaliny. Z výsledkov objemu plynu vyprodukovaného v rôznych časových intervaloch je možné stanoviť najvhodnejšie podmienky, ktoré umožňujú dve merania denne, každodenné získavanie značných objemov plynu a uvoľňovanie tlaku pri optimálnej citlivosti [1] bez strachu z výbuchov.

Pridanie testovaných chemikálií

26. Testované chemikálie rozpustné vo vode sa pridajú do prázdnych testovacích fliaš [bod 12 písm. b)] ako vodné roztoky (bod 18). Používajú sa najmenej tri série fliaš pre každý rozsah koncentrácií (bod 20). Nerozpustné

[1] Uvedené platí na experimentálnu zostavu a experimentálne podmienky, na základe ktorých je možné odhadnúť objemy vyprodukovaného plynu – z kontrolných slepých vzoriek a z nádob ukazujúcich 70 – 80 % inhibíciu – s prijateľnou mierou chybovosti.

▼M6

a slabo rozpustné testované chemikálie sa vo forme roztokov v organických rozpúšťadlách vstreknú do prázdnych fliaš pomocou mikrostriekačky tak, aby vznikli série replikátov všetkých piatich koncentrácií testovanej chemikálie. Rozpúšťadlo sa odparí prúdom plynného dusíka po povrchu roztoku v testovacích fľašiach. Alternatívne je možné pridať nerozpustné tuhé chemikálie ako odvážené množstvá tuhej látky priamo do testovacích fliaš.

27. Ak sa vo vode nerozpustné alebo slabo rozpustné kvapalné testované chemikálie nepridávajú pomocou rozpúšťadla, pridajú sa priamo mikrostriekačkou do testovacích fliaš po vložení inokula a testovacieho substrátu (pozri bod 30). Prchavé testované chemikálie sa môžu pridávať rovnakým spôsobom.

Pridanie inokula a substrátu

28. Do 5 litrovej fľaši [bod 12 písm. g)], do ktorej prúdi plynný dusík, sa zamieša primeraný objem preosiateho vyhnívajúceho kalu (pozri bod 16). Testovacími fľašami obsahujúcimi vodné roztoky alebo odparené roztoky testovaných chemikálií s rozpúšťadlami sa nechá prúdiť plynný dusík približne dve minúty, aby sa odstránil prítomný vzduch. Alikvotné množstvo, napríklad 100 ml, dobre premiešaného kalu sa vloží do testovacích fliaš pomocou pipety so širokým hrotom alebo do odmerného valca. Je nevyhnutné naplniť pipetu naraz presným požadovaným objemom kalu, vzhľadom na ľahké usadzovanie tuhých látok v kale. Ak sa naberie viac, je potrebné vyprázdniť pipetu a začať odznova.

29. Následne sa do zmesi pridá dostatočné množstvo substrátového roztoku (bod 17), aby sa získala koncentrácia 2 g/l jednotlivých živín, výťažok z kvasníc a D-glukóza, pričom dusík naďalej prúdi. Toto je príklad testovacej série.

Konečná hmotnostná koncentrácia testovanej chemikálie v testovacích fľašiach (mg/l)	Objem testovanej chemikálie (ml)		Reagenty a médiá (ml)		
	Zásobný roztok a) 10 g/l bod 18	Zásobný roztok b) 1 g/l bod 18	Riedenie vodou bod 14	Inokulum bod 16	Substrát bod 17
0	—	0	1,0	100	2
1	—	0,1	0,9	100	2
3,3	—	0,33	0,67	100	2
10	0,1	—	0,9	100	2
33	0,33	—	0,67	100	2
100	1,0	—	0	100	2

Celkový objem fľaše = 160 ml. Objem kvapaliny = 103 ml.
Objemu plynu = 57 ml alebo 35,6 % celkového objemu.

30. Podobne aj v prípade akejkoľvek prchavej a nerozpustnej kvapalnej testovanej chemikálie (pozri bod 27) sa dostatok prázdnych testovacích fliaš ošetrí prúdiacim plynným dusíkom.

▼M6

Kontrolné vzorky a referenčná chemikália

31. Pripravia sa najmenej tri súbory fliaš obsahujúcich iba kal a substrát, ktoré slúžia ako kontrolné vzorky. Pripravia sa aj ďalšie paralelné fľaše obsahujúce kal a substrát a tiež dostatočné množstvo zásobného roztoku referenčnej chemikálie, 3,5-dichlórfenolu (bod 21), aby bola výsledkom konečná koncentrácia 150 mg/l. Táto koncentrácia by mala inhibovať produkciu plynu približne o 50 %. Alternatívne sa pripraví séria koncentrácií referenčnej chemikálie. Okrem toho sa pripravia štyri osobitné fľaše na meranie pH, ktoré obsahujú kal, odkysličenú vodu a substrát. Do dvoch fliaš sa pridá testovaná chemikália s najvyššou koncentráciou, aká sa testuje, a do zostávajúcich dvoch fliaš sa pridá odkysličená voda.

32. Je potrebné zabezpečiť, aby všetky fľaše, s testovanou a referenčnou chemikáliou, ako aj s kontrolnými vzorkami, obsahovali rovnaký objem (V_R) kvapaliny. V prípade potreby sa na dosiahnutie tohto objemu do fľaše pridá odkysličená deionizovaná voda (bod 14). Uzavretý priestor nad kvapalinou by mal predstavovať 10 – 40 % objemu fľaše, pričom jeho skutočná hodnota sa vyberie z údajov získaných v rámci predbežného testu. Po pridaní všetkých zložiek do fliaš sa odstráni ihla, cez ktorú sa dodával plyn, a každá fľaša sa utesní gumovou zátkou a hliníkovým uzáverom [bod 12 písm. b)], pričom zátka sa zvlhčí kvapkou deionizovanej vody. Obsah každej fľaše sa premieša pretrepaním.

Inkubácia fliaš

33. Fľaše sa presunú do termostaticky regulovaného inkubátora, podľa možnosti vybaveného trepacím zariadením, s udržiavanou teplotou 35 °C ± 2 °C. Fľaše sa nechajú inkubovať v tme. Po približne jednej hodine sa vyrovná tlak vo fľašiach s atmosférickým tlakom tak, že sa injekčnou ihlou pripojenou k tlakomeru [bod 12 písm. c)] prepichne zátka každej fľaše, otvorí sa ventil, až kým tlakomer neukazuje nulu, a napokon sa ventil uzavrie. Ihla by sa mala zapichnúť pod uhlom približne 45°, aby sa zabránilo úniku plynu z fliaš. Ak sú fľaše inkubované v inkubátore bez trepacieho zariadenia, je potrebné ich ručne pretrepať dvakrát za deň počas celého inkubačného času na vyváženie systému. Obsah fliaš sa potom odstráni a zostávajúce fľaše sa ďalej inkubujú v tme. Prevrátenie však nie je vhodné v prípadoch, keď nerozpustné testované chemikálie môžu priľnúť ku dnu banky.

Meranie tlaku

34. Keď fľaše dosiahnu teplotu 35 °C ± 2 °C, odmeria a zaznamená sa pH obsahu dvoch zo štyroch fliaš pripravených na tento účel. Obsah fliaš sa potom odstráni a zostávajúce fľaše sa ďalej inkubujú v tme. Počas nasledujúcich 48 – 72 hodín sa dvakrát denne odmeria a zaznamená tlak vo fľašiach tak, že sa ihlou tlakomeru prepichne zátka každej fľaše, pričom ihla sa medzi meraniami vysuší. Všetky časti fľaše treba počas merania udržiavať na inkubačnej teplote a meranie by sa malo vykonať čo najrýchlejšie. Meranú hodnotu tlaku je potrebné nechať stabilizovať a potom ju zaznamenať. Následne sa otvorí ventil a opäť uzavrie, keď hodnota tlaku klesne na nulu. Test pokračuje zvyčajne 48 hodín od okamihu prvého vyrovnávania tlaku, ktorý sa označuje ako „čas 0“. Počet meraní a vyrovnávaní tlaku v prípade prchavých chemikálií by mal byť obmedzený na jedno (na konci inkubácie) alebo dve, aby sa minimalizovali straty testovanej chemikálie (10).

35. Ak je nameraná hodnota tlaku záporná, ventil sa neotvorí. V injekčnej ihle a hadičke sa niekedy hromadí vlhkosť, čo sa prejaví nízkou zápornou hodnotou tlaku. V takom prípade sa odoberie ihla, hadička sa potrasie a vysuší utierkou a nasadí sa nová ihla.

Meranie pH

36. Po záverečnom meraní tlaku sa odmeria a zaznamená hodnota pH obsahu každej fľaše.

▼M6

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Interpretácia výsledkov

37. Vypočíta sa suma a priemer zaznamenaných hodnôt tlaku v každom časovom intervale pre každý súbor paralelných fliaš a vypočíta sa stredná kumulovaná hrubá hodnota tlaku plynu v každom časovom intervale pre každý súbor replikátov. Zostroja sa krivky časovej závislosti strednej kumulatívnej produkcie plynu (v Pa) pre kontrolné, testovacie a referenčné fľaše. Na lineárnej časti krivky sa vyberie čas, zvyčajne 48 hodín, a pre každú koncentráciu sa vypočíta percentuálna hodnota inhibície (I) z rovnice [1]:

$$I = (1 - P_t/P_C) \times 100 \quad [1],$$

kde

I percentuálna inhibícia v %,

P_t tlak plynu vyprodukovaného s testovaným materiálom za zvolený čas v pascaloch (Pa),

P_c tlak plynu vyprodukovaného v kontrolnej vzorke za rovnaký čas v pascaloch (Pa).

Bolo by vhodné vypracovať obidva diagramy, t. j. diagram závislosti inhibície (I) od koncentrácie, ako aj od logaritmu koncentrácie tak, aby bolo možné vybrať krivku, ktorá má bližšie k linearite. Hodnota EC_{50} (mg/l) sa stanoví vizuálne alebo pomocou regresnej analýzy z krivky, ktorá má bližšie k linearite. Na porovnávacie účely môže byť užitočnejšie vyjadriť koncentráciu chemikálie v mg chemikálie/g celkovej sušiny. Táto koncentrácia sa vypočíta ako podiel objemovej koncentrácie (mg/l) a objemovej koncentrácie tuhých častíc sušiny kalu (g/l) (bod 16).

38. Vypočíta sa buď percentuálna hodnota inhibície dosiahnutá jednou koncentráciou použitej referenčnej chemikálie, alebo hodnota EC_{50}, ak sa skúmal dostatočný počet koncentrácií.

39. Stredná hodnota tlaku plynu vyprodukovaného v kontrolnej vzorke P_c (Pa) sa prevedie na objem na základe kalibračnej krivky tlakomeru (dodatok 2) a z toho sa vypočíta výťažok plynu, vyjadrený ako objem vyprodukovaný v priebehu 48 hodín zo 100 ml nezriedeného kalu pri koncentrácii tuhých látok 2 % (20 g/l) až 4 % (40 g/l).

Kritériá platnosti

40. Z výsledkov medzilaboratórnej skúšky ISO (5) vyplynulo, že referenčná chemikália (3,5-dichlórfenol) spôsobila 50 % inhibíciu produkcie plynu v rozsahu koncentrácií 32 – 510 mg/l, pričom stredná hodnota je 153 mg/l (bod 10). Tento rozsah je taký široký, že nie je možné spoľahlivo určiť pevné hranice inhibície ako kritériá platnosti. To by bolo možné, ak by ďalší vývoj ukázal, ako vyprodukovať konzistentnejšie inokulum. Objemy plynu vyprodukovaného v kontrolných fľašiach v priebehu 48 hodín sa pohybovali od 21 ml/g sušiny kalu do 149 ml/g sušiny kalu (stredná hodnota 72 ml/g). Neexistuje žiadny zjavný vzťah medzi objemom vyprodukovaného plynu a zodpovedajúcou hodnotou EC_{50}. Konečná hodnota pH sa pohybovala od 6,1 do 7,5.

41. Test sa považuje za platný, ak sa dosiahne inhibícia vyššia ako 20 % v referenčnej kontrolnej vzorke obsahujúcej 150 mg/l 3,5-dichlórfenolu, v kontrolnej slepej vzorke sa vyprodukuje viac ako 50 ml plynu na gram sušiny a hodnota pH na konci testu je v rozsahu 6,2 – 7,5.

Protokol o skúške

42. Protokol o skúške musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália

— bežný názov, chemický názov, číslo CAS, štrukturálny vzorec a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti,

▼M6

— čistota (nečistoty) testovanej chemikálie.

Podmienky testu

— objem kvapalného obsahu a uzavretého priestoru nad kvapalinou v testovacích nádobách,

— opis testovacích nádob a merania plynu (napr. typ tlakomeru),

— aplikácia testovanej chemikálie a referenčnej chemikálie do testovacieho systému, použité testovacie koncentrácie a použitie akýchkoľvek rozpúšťadiel,

— údaje o použitom inokule: názov čistiarne odpadových vôd, opis zdroja čistenej odpadovej vody (napr. prevádzková teplota, retenčný čas kalu, informácia, či prevažujú odpadové vody z domácností alebo priemyselné odpadové vody atď.), koncentrácia tuhých látok, činnosť produkcie plynu v anaeróbnej vyhnívacej nádrži, predchádzajúca expozícia alebo možná predbežná adaptácia na toxické chemikálie, alebo miesto odberu kalu, sedimentu atď.,

— teplota a rozsah inkubácie,

— počet replikátov.

Výsledky

— hodnoty pH na konci testu,

— všetky zhromaždené namerané údaje z testovacích nádob, slepých kontrolných nádob a kontrolných nádob s referenčnou chemikáliou, v prípade potreby v tabuľkovej forme (napr. tlak v Pa alebo milibaroch),

— percentuálna inhibícia v testovacích a referenčných fľašiach a krivky závislosti inhibície od koncentrácie,

— vypočítané hodnoty EC_{50}, vyjadrené v mg/l a mg/g,

— produkcia plynu na gram kalu za 48 hodín,

— dôvody na akékoľvek odmietnutie výsledkov testu,

— diskusia o výsledkoch vrátane odchýlok od postupov v rámci tejto testovacej metódy a diskusia o akýchkoľvek odchýlkach od očakávaných výsledkov testu v dôsledku interferencií a chýb;

— uvedie sa tiež, či účelom testu bolo meranie toxicity na mikroorganizmy, ktoré už boli vystavené alebo ktoré ešte neboli vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie.

LITERATÚRA

1. Chapter C.11 of this Annex: Activated Sludge, Respiration Inhibition Test.

2. Chapter C.43 of this Annex: Anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge: method by measurement of gas production.

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.

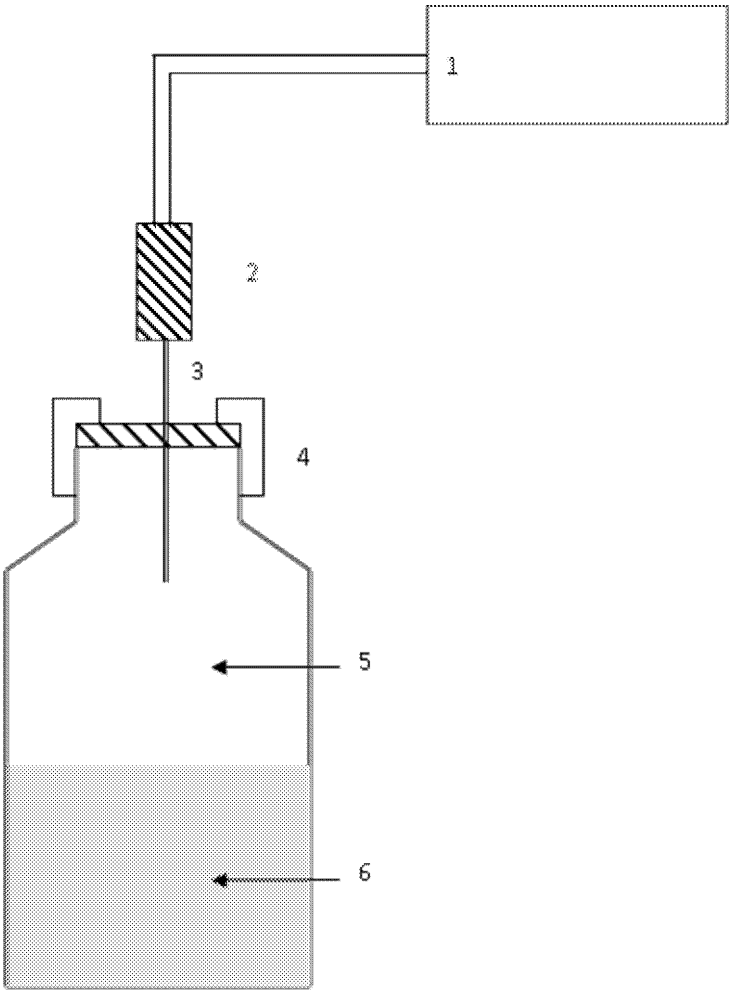
12. International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

13. International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Dodatok 1

Príklad zariadenia na meranie produkcie bioplynu podľa tlaku plynu



Legenda:

1 – tlakomer

2 – plynotesný trojcestný ventil

3 – injekčná ihla

4 – plynotesný uzáver (tesniaci uzáver a priehradka)

5 – uzavretý priestor nad kvapalinou

6 – inokulum vyhnívajúceho kalu

Testovacie nádoby v prostredí s teplotou 35 °C ± 2 °C.

▼M6

Dodatok 2

Konverzia tlakomera

Údaje tlakomeru sa môžu pomocou štandardnej krivky dať do vzťahu s objemom plynu a z toho sa môže vypočítať objem vyprodukovaného plynu na gram sušiny kalu za 48 hodín. Tento index aktivity sa použije ako jedno z kritérií, ktorými sa zhodnotí platnosť výsledkov testu. Kalibračná krivka sa vypracuje vstreknutím známeho množstva plynu pri teplote 35 °C ± 2 °C do sérových fliaš, ktoré obsahujú rovnaký objem vody, ako je objem reakčnej zmesi (V_R).

— Alikvotné množstvo vody V_R (ml) udržiavanej pri teplote 35 °C ± 2 °C sa rozdelí do piatich sérových fliaš. Fľaše sa pevne uzavrú a na 1 hodinu umiestnia do vodného kúpeľa s teplotou 35 °C ± 2 °C, aby sa systém dostal do rovnováhy.

— Zapne sa tlakomer, nechá sa stabilizovať a nastaví sa na nulu.

— Injekčnou ihlou sa prepichne zátka jednej z fliaš, otvorí sa ventil, až kým tlakomer neukáže nulovú hodnotu, potom sa ventil uzavrie.

— Postup sa opakuje so zostávajúcimi fľašami.

— Do každej fľaše sa vstrekne 1 ml vzduchu s teplotou 35 °C ± 2 °C. Ihlou (tlakomera) sa prepichne zátka jednej z fliaš a nechá sa stabilizovať meraná hodnota tlaku. Hodnota tlaku sa zaznamená, otvorí sa ventil, až kým tlakomer neukáže nulovú hodnotu, potom sa ventil uzavrie.

— Postup sa opakuje so zostávajúcimi fľašami.

— Celý postup sa opakuje s použitím 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml a 50 ml vzduchu.

— Zostrojí sa konverzná krivka závislosti tlaku (Pa) od objemu vstreknutého plynu (ml). Reakcia zariadenia je lineárna v rozsahu 0 – 70 000 Pa a 0 – 50 ml vyprodukovaného plynu.

▼M6

Dodatok 3

Známe faktory, ktoré môžu viesť k nesprávnym výsledkom

a) *Kvalita uzáverov fliaš*

Rozličné typy priehradiek pre sérové fľaše sú komerčne dostupné, mnohé z nich vrátane butylkaučukových však strácajú tesnosť, keď sa prepichnú ihlou podľa podmienok testu. Niekedy dochádza po prepichnutí priehradky injekčnou ihlou k veľmi pomalému poklesu tlaku. S cieľom predísť únikom plynu sa odporúča používať plynotesné priehradky [bod 12 písm. b)].

b) *Vlhkosť v injekčnej ihle*

V injekčnej ihle a hadičke sa niekedy hromadí vlhkosť, čo sa prejaví nízkou zápornou hodnotou tlaku. Napraví sa to tak, že sa odoberie ihla, hadička sa potrasie a vysuší utierkou a nasadí sa nová ihla [body 12 písm. c) a 35].

c) *Kontaminácia kyslíkom*

Anaeróbne metódy sú náchylné na chyby spôsobené kontamináciou kyslíkom, čo môže spôsobiť nižšiu produkciu plynu. V rámci tejto metódy by sa takáto možnosť mala minimalizovať pomocou prísne anaeróbnych techník vrátane používania odkladacej schránky.

d) *Hrubé substráty v kale*

Anaeróbnu produkciu plynu a citlivosť kalu ovplyvňujú substráty, ktoré sa prenášajú s inokulom do testovacích fliaš. Vyhnívajúci kal z domových anaeróbnych vyhnívacích nádrží často obsahuje rozpoznateľný materiál ako chlpy a celulózové zvyšky rastlín, ktoré majú tendenciu sťažovať získavanie reprezentatívnych vzoriek. Preosiatím kalu je možné odstrániť hrubé nerozpustné látky, čo zvyšuje pravdepodobnosť odberu reprezentatívnych vzoriek (bod 16).

e) *Prchavé testované chemikálie*

Prchavé testované chemikálie sa uvoľnia do uzavretého priestoru nad kvapalinou v testovacích fľašiach. To môže viesť k určitej strate testovaného materiálu zo systému počas ventilácie po meraniach tlaku, čím by sa získali nepravdivo vysoké hodnoty koncentrácie EC_{50}. Chybu je možné znížiť vhodným výberom pomeru objemu uzavretého priestoru nad kvapalinou k objemu kvapaliny a vynechaním ventilácie po vykonaní merania tlaku (10).

f) *Nelinearita produkcie plynu*

Ak krivka závislosti strednej kumulatívnej produkcie plynu od času inkubácie nie je za 48-hodinové obdobie približne lineárna, presnosť testovania sa môže znížiť. Na prekonanie tejto skutočnosti sa odporúča použiť vyhnívajúci kal z iného zdroja a/alebo zvýšiť koncentráciu testovacieho substrátu živín, výťažku z kvasníc a glukózy (bod 29).

▼M6

Dodatok 4

Aplikácia na environmentálne vzorky s nízkou koncentráciou biomasy – anaeróbnych kalov, sedimentov atď.

ÚVOD

A.1 Vo všeobecnosti je špecifická mikrobiálna aktivita (objem plynu vyprodukovaného na gram sušiny) prirodzene sa vyskytujúcich anaeróbnych kalov, sedimentov, pôd atď. oveľa nižšia ako aktivita anaeróbneho kalu získaného z odpadových vôd. Z tohto dôvodu, ak sa majú merať inhibičné účinky chemikálií na tieto menej aktívne vzorky, musia sa upraviť niektoré experimentálne podmienky. V prípade týchto menej aktívnych vzoriek sú možné dva všeobecné postupy:

a) vykoná sa upravená predbežná skúška (bod 25) s nezriedenou vzorkou kalu, pôdy atď. pri teplote 35 °C ± 2 °C alebo pri teplote, aká bola na mieste odberu vzorky, čím sa dosiahne presnejšia simulácia (ako v časti 1 normy ISO 13 641);

b) alebo sa vykoná test so zriedeným (1: 100) kalom z vyhnívacej nádrže, čím sa simuluje nízka aktivita, ktorá sa očakáva od environmentálnej vzorky, pričom teplota sa udržiava na hodnote 35 °C ± 2 °C (ako v časti 2 normy ISO 13 641).

A.2 Možnosť a) je možné realizovať pomocou tu opísanej metódy (rovnocennej s metódou uvedenou v časti 1 normy ISO 13 641), ale je nevyhnutné vykonať predbežnú skúšku (bod 25), aby sa zabezpečili optimálne podmienky, pokiaľ už nie sú známe z predchádzajúceho testovania. Vzorka kalu alebo sedimentu by sa mala dôkladne premiešať, napríklad v miešadle, a v prípade potreby zriediť malým množstvom odvzdušnenej vody (bod 14) tak, aby bola dostatočne mobilná na premiestnenie pomocou pipety so širokým hrotom alebo odmerného valca. Ak sa množstvo živín považuje za nedostatočné, vzorka sa môže odstrediť (za anaeróbnych podmienok) a opätovne suspendovať v minerálnom médiu, ktoré obsahuje výťažok z kvasníc (A.11).

A.3 Možnosť b) primerane imituje nízku aktivitu environmentálnych vzoriek, ale koncentrácia suspendovaných tuhých látok prítomných v týchto vzorkách nie je vysoká. Úloha týchto tuhých látok v inhibícii nie je známa, ale je možné, že výsledkom reakcie testovaných chemikálií a zložiek kalu, ako aj adsorpcie testovaných chemikálií na tuhé látky, by mohlo byť zníženie toxicity testovanej chemikálie.

A.4 Ďalším dôležitým faktorom je teplota: v rámci prísnej simulácie by sa testy mali vykonávať pri teplote, aká bola na mieste odberu vzorky, keďže o rôznych skupinách baktérií produkujúcich metán je známe, že sú aktívne v rozličných teplotných rozsahoch, konkrétne termofily (~ 30 – 35 °C), mezofily (20 – 25 °C) a psychrofily (< 20 °C), ktoré môžu vykazovať rôzne inhibičné vlastnosti.

A.5 Trvanie: v rámci všeobecného testu bola v časti 1, s použitím nezriedeného kalu, produkcia plynu v trvaní 2 až 4 dni vždy dostatočná, zatiaľ čo v časti 2 s použitím stokrát zriedeného kalu sa za tento čas v rámci medzilaboratórnej porovnávacej skúšky nevyprodukoval dostatok plynu, ak vôbec nejaký. Madsen a kol. (1996) pri opise tohto druhého testu uvádzajú, že k dispozícii by malo byť najmenej sedem dní.

Testovanie s nízkou koncentráciou biomasy (možnosť b)

Vykonať by sa mali tieto zmeny, ktorými sa dopĺňajú alebo nahrádzajú niektoré existujúce body a podbody hlavného textu.

▼**M6**

A.6 K bodu 6 sa dopĺňa: Princíp skúšky:

„Táto technika sa môže používať s anaeróbnym kalom zriedeným v pomere 1: 100, čiastočne na simuláciu nízkej aktivity kalov a sedimentov. Inkubačná teplota môže byť buď 35 °C, alebo rovnaká, aká bola na mieste odberu vzorky. Keďže bakteriálna aktivita je oveľa nižšia ako v nezriedenom kale, inkubačný čas by sa mal predĺžiť najmenej na sedem dní.“

A.7 K bodu 12 a) sa dopĺňa:

„inkubátor by mal byť schopný prevádzky až do teploty 15 °C.“

A.8 Za bod 13 sa dopĺňa ďalší reagent:

„kyselina fosforečná (H_3PO_4) 85 % hmotnosti vo vode.“

A.9 Na koniec bodu 16 sa dopĺňa:

„V rámci testu sa použije konečná koncentrácia 0,20 g/l ± 0,05 g/l celkovej sušiny.“

A.10 Bod 17: Testovací substrát

Tento substrát sa nepoužije, ale nahradí sa výťažkom z kvasníc (pozri body 17, A.11, A.12, A.13).

A.11 Na zriedenie anaeróbneho kalu je potrebné minerálne médium vrátane stopových prvkov a na zjednodušenie sa do tohto média pridá organický substrát, výťažok z kvasníc.

Za bod 17 sa dopĺňa:

„a) Testovacie minerálne médium s výťažkom z kvasníc

Pripravuje sa z desaťnásobne koncentrovaného testovacieho média [bod 17 písm. b), A.12], s roztokom stopového prvku [bod 17 písm. c), A.13]. Použije sa čerstvo dodaný nonahydrát sulfidu sodného [bod 17 písm. b), A.12], alebo sa pred použitím prepláchne a vysuší, aby sa zabezpečilo, že bude mať dostatočnú redukčnú kapacitu. Ak sa test vykonáva bez použitia odkladacej schránky [bod 17 písm. j)], koncentrácia sulfidu sodného v zásobnom roztoku by sa mala zvýšiť na 2 g/l (z hodnoty 1 g/l). Sulfid sodný sa môže pridávať aj z vhodného zásobného roztoku cez priehradku uzavretých testovacích fliaš, keďže tento postup znižuje riziko oxidácie, až do dosiahnutia konečnej koncentrácie 0,2 g/l. Alternatívne sa môže použiť titánium-citrát [bod 17 písm. b)]. Pridáva sa cez priehradku uzavretých testovacích fliaš, aby sa dosiahla koncentrácia 0,8 – 1,0 mmol/l. Titánium-citrát je vysokoúčinné a málo toxické redukčné činidlo, ktoré sa pripraví takto: rozpustí sa 2,94 g dihydrátu citrátu trisodného v 50 ml odkysličenej vody (bod 14) (čoho výsledkom je roztok 200 mmol/l) a pridá sa 5 ml roztoku titánium-chlorátu (15 g/100 ml vody). Činidlo sa pomocou uhličitanu sodného neutralizuje na pH 7 ± 0,5 a do vhodnej sérovej fľaše sa naleje v prúde plynného dusíka. Koncentrácia titánium-citrátu v tomto zásobnom roztoku je 164 mmol/l. Testovacie médium sa má použiť okamžite alebo skladovať pri teplote 4 °C najdlhšie 1 deň.

A.12 b) Desaťnásobne koncentrované testovacie médium sa pripraví z týchto zložiek:

bezvodý dihydrogénfosforečnan draselný (KH_2PO_4)	2,7 g
hydrogénfosforečnan disodný (Na_2HPO_4)	4,4 g
(alebo 11,2 g dodekahydrátu)	5,3 g
chlorid amónny (NH_4Cl)	

▼**M6**

dihydrát chloridu vápenatého ($CaC1_2$ $2H_2O$)	0,75 g
hexahydrát chloridu horečnatého ($MgCl_2$ $6H_2O$)	1,0 g
tetrahydrát chloridu železnatého ($FeCl_2$ $4H_2O$)	0,2 g
resazurín (oxidačno-redukčný indikátor)	0,01 g
nonahydrát sulfidu sodného (Na_2S $9H_2O$)	1,0 g
(alebo titánium-citrát) konečná koncentrácia	0.8 mmol/l až 1.0 mmol/l
roztok stopových prvkov [pozri bod 17 písm. c), A.13]	10,0 ml
výťažok z kvasníc	100 g
rozpustí sa vo vode (bod 14) a doplní sa do:	1 000 ml

A.13 c) Roztok stopových prvkov sa pripraví z týchto zložiek:

tetrahydrát chloridu mangánatého ($MnCl_2$ · $4H_2O$)	0,5 g
kyselina boritá (H_3BO_3)	0,05 g
chlorid zinočnatý ($ZnCl_2$)	0,05 g
chlorid meďnatý ($CuCl_2$)	0,03 g
dihydrát molybdénanu sodného (Na_2MoO_4 · $2H_2O$)	0,01 g
hexahydrát chloridu kobaltnatého ($CoCl_2$ · $6H_2O$)	1,0 g
hexahydrát chloridu nikelnatého ($NiCl_2$ · $6H_2O$)	0,1 g
seleničitan sodný (Na_2SeO_3)	0,05 g
rozpustí sa vo vode (bod 14) a doplní sa do:	1 000 ml“

A.14 Bod 25: Predbežná skúška

Je dôležité, aby sa predbežná skúška vykonala tak, ako je opísané v bode 24, s výnimkou toho, že koncentrácia tuhých látok v kale by mala predstavovať jednu stotinu uvedenej hodnoty, teda 0,1 g/l, 0,2 g/l a 0,4 g/l. Inkubácia by mala trvať najmenej 7 dní.*Poznámka:* V rámci medzilaboratórnej porovnávacej skúšky (5) bol objem uzavretého priestoru nad kvapalinou príliš veľký – až 75 % celkového objemu. Táto hodnota by mala byť v odporúčanom rozsahu od 10 do 40 %. Dôležitým kritériom je, že objem plynu vyprodukovaného pri inhibícii približne 80 % by mal byť merateľný s prijateľnou presnosťou (napr. ± 5 % až ± 10 %).

A.15 Body 26 až 30: Pridanie testovanej chemikálie, inokula a substrátu

Pridávanie prebieha tým istým spôsobom, ako je uvedené v daných bodoch, ale substrátový roztok (bod 17) sa nahradí substrátom testovacieho média a výťažku z kvasníc (A.11).

Okrem toho sa konečná koncentrácia sušiny kalu znížila z 2 – 4 g/l na 0,2 g/l ± 0,05 g/l (A.9). Dva príklady pridávania zložiek testovacej zmesi sú uvedené v tabuľke A.1, ktorá nahrádza tabuľku uvedenú v bode 29.

A.16 Bod 33: Inkubácia fliaš

Vzhľadom na očakávanú nižšiu mieru produkcie plynu sa inkubácia vykonáva najmenej 7 dní.

▼**M6**

A.17 Bod 34: Meranie tlaku

Na meranie tlaku v uzavretom priestore nad kvapalinou vo fľašiach sa používa rovnaký postup, ako je opísané v bode 34, ak je potrebné zistiť množstvá v plynnej fáze. Ak sa má merať celkové množstvo CO_2 a CH_4, pH kvapalnej fázy sa zníži približne na hodnotu 2 vstreknutím H_3PO_4 do každej príslušnej fľaše, pričom sa tlak meria po 30-minútovom pretrepávaní pri testovacej teplote. Viac informácií o kvalite inokula je však možné získať meraním tlaku v každej fľaši pred okyslením a po ňom. Napríklad ak je miera produkcie CO_2 oveľa vyššia ako miera produkcie metánu, citlivosť fermentatívnych baktérií sa môže zmeniť a/alebo testovaná chemikália v prvom rade ovplyvní metanogénne baktérie.

A.18 Bod 36: Meranie pH

Ak sa má použiť H_3PO_4, je potrebné pripraviť ďalšie fľaše, do ktorých sa H_3PO_4 nepridá, zvlášť ak sa má merať pH.

LITERATÚRA:

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.

Tabuľka A.1.

Príklady nastavenia pre testovacie dávky

Zložky reakčnej zmesi	Príklad 1	Príklad 2	Bežné poradie pridávania
Koncentrácia pripraveného inokula (g/l)	0,42	2,1	—
Objem pridaného inokula (ml)	45	9	4
Koncentrácia inokula v testovacích fľašiach (g/l)	0,20	0,20	—
Objem pridaného testovacieho média (ml)	9	9	2
Objem vody pridanej na riedenie (ml)	36	72	3
Koncentrácia výťažku z kvasníc v testovacích fľašiach (g/l)	9,7	9,7	—
Objem zásobného roztoku testovanej chemikálie (ml)	3	3	1
Celkový objem kvapaliny (ml)	93	93	—

▼**M6**

Dodatok 5

Vymedzenie pojmov

Na účely tejto testovacej metódy sa používa toto vymedzenie pojmov:

Chemikália je látka alebo zmes.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

▼M6

C.35. TEST TOXICITY PRE ČERVY RODU *LUMBRICULUS* V SYSTÉME SEDIMENT – VODA ZA POUŽITIA OBOHATENÉHO SEDIMENTU

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 225 (2007). Endobentózne organizmy, ktoré sa živia sedimentmi, sú potenciálne vystavené silnému pôsobeniu chemikálií naviazaných na sedimenty, a preto by sa im mala venovať zvýšená pozornosť, napr. (1), (2), (3). Medzi takýmito živočíchmi zohrávajú dôležitú úlohu vodné máloštetinavce (trieda *Oligochaeta*) v sedimentoch vodných systémov. Tieto živočíchy svojou bioturbáciou sedimentu a tým, že slúžia ako korisť, môžu mať silný vplyv na biologickú dostupnosť takýchto chemikálií pre iné organizmy, napr. ryby, ktoré sa živia bentosom. Na rozdiel od epibentóznych organizmov sa endobentózne vodné máloštetinavce (napr. dážďovička pestrá, *Lumbriculus variegatus*) zahrabávajú do sedimentu a živia sa časticami sedimentu pod jeho povrchom. Tým je zabezpečené, že testované organizmy sú vystavené pôsobeniu testovaných chemikálií všetkými možnými spôsobmi (napr. dotykom s kontaminovanými časticami usadenín a ich požitím, ale aj prostredníctvom vody v póroch sedimentov a nadložnej vody).

2. Táto testovacia metóda bola vypracovaná s cieľom posúdiť účinky dlhodobého pôsobenia chemikálií naviazaných na sedimenty na endobentózne máloštetinavce druhu *Lumbriculus variegatus* (Müller). Vychádza z existujúcich protokolov testu toxicity a bioakumulácie v sedimente, napr. (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Metóda je opísaná pre statické podmienky testu. Expozičným scenárom použitým v rámci tejto testovacej metódy je obohacovanie sedimentu testovanou chemikáliou. Použitie obohateného sedimentu je určené na simuláciu prípadu sedimentu kontaminovaného testovanou chemikáliou.

3. Chemikálie, ktoré je potrebné testovať na organizmoch žijúcich v sedimente, zvyčajne pretrvajú v tomto prostredí dlhý čas. Organizmy žijúce v sedimente môžu byť exponované viacerými spôsobmi. Relatívny význam každého spôsobu expozície a časové obdobie, v ktorom sa každý z nich podieľa na celkových toxických účinkoch, závisí od fyzikálno-chemických vlastností danej chemikálie a jej konečného osudu v tele živočícha. V prípade silno adsorbujúcich chemikálií (napr. s hodnotou log K_{ow} > 5) alebo chemikálií, ktoré sa kovalentne viažu na sediment, môže byť významným spôsobom expozície prijímanie kontaminovanej potravy. S cieľom vyhnúť sa podhodnoteniu toxicity takých chemikálií sa potrava potrebná na reprodukciu a rast testovaných organizmov pridá do sedimentu pred aplikáciou testovanej chemikálie (11). Opísaná testovacia metóda je dostatočne podrobná, aby test bolo možné vykonať s možnosťou úprav experimentálnej koncepcie v závislosti od podmienok v jednotlivých laboratóriách a od rôznych vlastností testovaných chemikálií.

4. Testovacia metóda je zameraná na stanovenie účinkov testovanej chemikálie na reprodukciu a biomasu testovaných organizmov. Meranými biologickými parametrami sú celkový počet prežívajúcich červov a množstvo biomasy (suchá hmotnosť) na konci expozície. Tieto údaje sa analyzujú buď prostredníctvom regresného modelu na odhadnutie koncentrácie, ktorá by spôsobila účinok x % (napr. EC_{50}, EC_{25} a EC_{10}), alebo prostredníctvom testovania štatistickej hypotézy na stanovenie koncentrácie bez pozorovaného účinku (NOEC) a najnižšej koncentrácie s pozorovaným účinkom (LOEC).

5. V kapitole C.27 tejto prílohy, „Test toxicity *Chironomidae* v systéme sediment – voda za použitia obohateného sedimentu“ (6), je uvedených mnoho základných a užitočných informácií týkajúcich sa postupu metódy testovania toxicity v sedimente. Tento dokument teda slúži ako základ pre vypracované úpravy potrebné na vykonávanie testov toxicity v sedimente s máloštetinavcami druhu *Lumbriculus variegatus*. Medzi ďalšie použité dokumenty patria

▼M6

napríklad štandardná príručka ASTM na stanovenie bioakumulácie kontaminantov naviazaných na sedimenty bentóznymi bezstavovcami (3), metódy US EPA na meranie toxicity a bioakumulácie kontaminantov naviazaných na sedimenty sladkovodnými bezstavovcami (7) a štandardná príručka ASTM na zber, uchovávanie, charakterizáciu a manipuláciu sedimentov na toxikologické testovanie a na výber vzoriek pri zbere bentóznych bezstavovcov (12). Okrem toho sú dôležitým zdrojom informácií na vypracovanie tohto dokumentu praktické skúsenosti získané počas medzilaboratórnej porovnávacej skúške testovacej metódy [(13), protokol o medzilaboratórnej porovnávacej skúške] a údaje z literatúry.

ZÁKLADNÉ A USMERŇUJÚCE INFORMÁCIE

6. Informácie o testovanej chemikálii, ako sú bezpečnostné opatrenia, vhodné podmienky skladovania a analytické metódy, je potrebné získať pred začiatkom štúdie. Usmernenia týkajúce sa fyzikálno-chemických vlastností testovaných chemikálií, ktoré sťažujú ich testovanie, sú uvedené v literatúre pod číslom (14).

7. Pred vykonaním testu by mali byť známe tieto informácie o testovanej chemikálii:

   — bežný názov, chemický názov (podľa možnosti názov IUPAC), štrukturálny vzorec, registračné číslo CAS, čistota,

   — tlak pary,

   — rozpustnosť vo vode.

8. Za užitočné pred začiatkom testu sa považujú tieto doplňujúce informácie:

   — rozdeľovacia konštanta oktanol – voda, K_{ow},

   — rozdeľovacia konštanta organický uhlík – voda, vyjadrený ako K_{oc},

   — hydrolýza,

   — fototransformácia vo vode,

   — biodegradovateľnosť,

   — povrchové napätie.

9. Pred začiatkom testu by sa mali získať informácie o určitých vlastnostiach sedimentu (7). Podrobnosti sú uvedené v bodoch 22 až 25.

PRINCÍP TESTU

10. Červy v podobnom fyziologickom stave (synchronizované, ako je opísané v dodatku 5), sa vystavia pôsobeniu série koncentrácií toxickej chemikálie, aplikovanej na fázu sedimentu v systéme sediment – voda. Ako médium by sa mal použiť umelý sediment a rekonštituovaná voda. Testovacie nádoby bez pridania testovacej chemikálie slúžia ako kontrolné vzorky. Sediment sa obohatí o testovanú chemikáliu hromadne pre každú úroveň koncentrácie s cieľom minimalizovať variabilitu medzi replikátmi každej úrovne koncentrácie. Následne sa testované organizmy umiestnia do testovacích nádob, v ktorých sú koncentrácie sedimentu a vody vyvážené (pozri bod 29). Testované živočíchy sú vystavené pôsobeniu systémov sediment – voda 28 dní. Vzhľadom na nízky obsah živín v umelom sedimente by sa mal sediment upraviť zdrojom potravy (pozri body 22 a 23 a dodatok 4), aby sa zabezpečilo, že červy budú rásť a rozmnožovať sa v rámci podmienok regulácie. Týmto spôsobom sa zabezpečí, aby boli testované živočíchy exponované účinkom vody a sedimentu, ako aj ich potravy.

11. Uprednostňovaným parametrom v rámci tohto typu štúdie je koncentrácia EC_x (napr. EC_{50}, EC_{25} a EC_{10}, účinná koncentrácia, ovplyvňujúca x % testovaných organizmov) pre reprodukciu a množstvo biomasy, v porovnaní s kontrolnými vzorkami. Je však potrebné si uvedomiť, že vzhľadom na veľkú neistotu nízkej hodnoty EC_x (napr. EC_{10}, EC_{25}) s extrémne vysokými

▼M6

hranicami spoľahlivosti (95 %) [napr. (15)] a štatistickú významnosť vypočítanú počas testovania hypotézy sa za najpevnejší konečný parameter považuje koncentrácia EC_{50}. Okrem toho sa pre množstvo biomasy a reprodukciu môže vypočítať koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC) a najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC), ak koncepcia a údaje testu podporujú tieto výpočty (pozri body 34 až 38). Účel štúdie, odvodenie koncentrácií EC_x alebo NOEC, bude závisieť od koncepcie testu.

REFERENČNÉ TESTY

12. Očakáva sa, že výsledky s kontrolnými organizmami dostatočne preukážu schopnosť laboratória vykonať test, a ak sú k dispozícii historické údaje, aj opakovateľnosť testu. Okrem toho sa môžu v pravidelných intervaloch vykonávať referenčné testy toxicity s použitím referenčnej toxickej chemikálie na posúdenie citlivosti testovaných organizmov. Citlivosť a stav testovaných živočíchov môžu uspokojivo preukázať referenčné testy toxicity iba vo vode, v trvaní 96 hodín (4) (7). Informácie o toxicite pentachlórfenolu (PCP) v úplných testoch (28-dňová expozícia v obohatenom sedimente) sú uvedené v dodatku 6 a v protokole o medzilaboratórnej porovnávacej skúške testovacej metódy (13). Akútna toxicita PCP iba vo vode je opísaná v literatúre, napr. (16). Tieto informácie sa môžu použiť na porovnanie citlivosti testovacieho organizmu v referenčných testoch s PCP ako referenčnou toxickou chemikáliou. Ako referenčné toxické chemikálie pre druh *L. variegatus* sa odporúčajú chlorid draselný (KCl) alebo síran meďnatý ($CuSO_4$) (4) (7). V súčasnosti je stanovenie kvalitatívnych kritérií založených na údajoch o toxicite pre KCl zložité z dôvodu nedostatku údajov v literatúre pre druh *L. variegatus*. Informácie o toxicite medi voči druhu *L. variegatus* je možné nájsť v bodoch (17) až (21).

PLATNOSŤ TESTU

13. Ak má byť test platný, mali by byť splnené tieto požiadavky:

— medzilaboratórna porovnávacia skúška (13) ukázala, že pre druh *Lumbriculus variegatus* by mal priemerný počet žijúcich červov v jednom replikáte kontrolnej vzorky vzrásť najmenej o faktor 1,8 na konci expozície v porovnaní s počtom červov v jednom replikáte na jej začiatku,

— hodnota pH nadložnej vody by mala byť počas testu 6 až 9,

— koncentrácia kyslíka v nadložnej vode by počas testu nemala byť nižšia ako 30 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka pri testovacej teplote.

OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Testovací systém

14. Odporúčajú sa statické systémy bez obnovy nadložnej vody. Ak je pomer sedimentu a vody (pozri bod 15) vhodný, jemné prevzdušňovanie bude spravidla stačiť na udržanie kvality vody na prijateľnej úrovni pre testované organizmy (napr. na maximalizáciu hladiny rozpusteného kyslíka, minimalizáciu vzniku produktov vylučovania). Semistatické alebo prietokové systémy s prerušovaným alebo sústavným obnovovaním nadložnej vody by sa mali využívať len vo výnimočných prípadoch, keďže pravidelné obnovovanie nadložnej vody môže ovplyvniť chemickú rovnováhu (napr. straty testovanej chemikálie z testovacieho systému).

Testovacie nádoby a zariadenie

15. Expozícia by mala prebiehať v sklených kadičkách, napr. s objemom 250 ml a priemerom 6 cm. Použiť sa môžu aj iné vhodné sklené nádoby, ale mali by zaručiť primeranú hĺbku nadložnej vody a sedimentu. Do každej nádoby by sa mala vložiť vrstva 1,5 – 3 cm umelo pripraveného sedimentu. Pomer hĺbky vrstvy sedimentu a hĺbky nadložnej vody by mal byť 1: 4.

▼M6

Nádoby by mali mať vhodnú veľkosť, ktorá zodpovedá veľkosti náplne, t. j. počtu vložených testovaných červov pripadajúcich na jednotku hmotnosti sedimentu (pozri tiež bod 39).

16. Testovacie nádoby a ďalšie zariadenia, ktoré prídu do styku s testovacími chemikáliami, by mali byť vyrobené výlučne zo skla alebo z iného chemicky inertného materiálu. Treba dbať na to, aby sa pri všetkých častiach zariadenia predišlo používaniu materiálov, ktoré sa môžu rozpúšťať, môžu absorbovať testované chemikálie alebo vylúhovať iné chemikálie a mať škodlivé účinky na testované živočíchy. Všetko zariadenie, ktoré prichádza do styku s testovacími médiami, by malo byť vyrobené z polytetrafluóretylénu, nehrdzavejúcej ocele a/alebo zo skla. V prípade organických chemikálií, o ktorých je známa ich adsorpcia na sklo, môže byť potrebné použiť posilanizované sklo. V takýchto prípadoch je potrebné zariadenia po skončení pokusu zlikvidovať.

Testované druhy

17. Testovaný druh používaný pri takomto type štúdií predstavujú sladkovodné máloštetinavce *Lumbriculus variegatus* (Müller). Tento druh je tolerantný voči širokej škále typov sedimentov a vo veľkej miere sa využíva na testovanie toxicity a bioakumulácie v sedimente [napr. (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)]. Uvádzať by sa mal pôvod testovaných živočíchov, potvrdenie identity druhu [napr. (36)], ako aj podmienky kultúry. Identifikácia druhu sa nevyžaduje pred každým testom, ak organizmy pochádzajú z internej kultúry.

Kultivácia testovaných organizmov

18. S cieľom mať dostatočný počet červov na vykonávanie testov toxicity v sedimente je vhodné uchovávať ich v stálej laboratórnej kultúre. Usmernenie pre metódy laboratórnej kultúry druhu *Lumbriculus variegatus* a zdroje štartovacích kultúr sú uvedené v dodatku 5. Podrobné informácie o kultivovaní tohto druhu sú uvedené v literatúre (3), (7), (27).

19. Na zabezpečenie toho, aby sa testy vykonávali so živočíchmi toho istého druhu, sa dôrazne odporúča vytvorenie kultúr jedného druhu. Je potrebné tiež zabezpečiť, aby kultúry a najmä červy použité v testoch boli bez zjavných chorôb a abnormalít.

Voda

20. Ako nadložnú vodu v testoch sa odporúča používať vodu rekonštituovanú podľa kapitoly C.1 tejto prílohy (37). Tá sa môže používať aj pre laboratórne kultúry červov (príprava je opísaná v dodatku 2). Ak je to potrebné, môže sa používať aj prírodná voda. Zvolená voda musí mať takú kvalitu, aby umožnila rast a reprodukciu testovaného druhu počas celého obdobia aklimatizácie a testovania bez toho, že by sa prejavil nezvyčajný vzhľad alebo správanie. Druh *Lumbriculus variegatus* preukázal schopnosť prežiť, rásť a rozmnožovať sa v tomto type vody (30) a umožňuje maximálnu štandardizáciu testovacích a kultivačných podmienok. Ak sa použije rekonštituovaná voda, je potrebné uviesť jej zloženie a pred použitím by mali byť známe prinajmenšom údaje o jej hodnote pH, obsahu kyslíka a tvrdosti (vyjadrenej v mg $CaCO_3$/l). Užitočné informácie by mohla poskytnúť analýza vody na mikropolutanty pred jej použitím (pozri napr. dodatok 3).

21. Hodnota pH nadložnej vody by mala byť v rozsahu 6,0 – 9,0 (pozri bod 13). Ak sa očakáva zvýšená produkcia amoniaku, považuje sa za užitočné udržiavať hodnotu pH v rozsahu 6,0 – 8,0. Na testovanie napríklad slabých organických kyselín je vhodné upraviť pufrovaním hodnotu pH vody, ktorá sa má používať v rámci testu, ako sa uvádza v literatúre, napr. pod číslom (16). V prípade prírodnej vody, ktorá sa má používať v rámci testu, by jej celková tvrdosť mala byť v rozsahu 90 – 300 mg $CaCO_3$ na liter. V dodatku 3 sú zhrnuté ďalšie kritériá pre vhodnú vodu na riedenie podľa usmernenia OECD č. 210 (38).

▼M6

Sediment

22. Keďže nekontaminované prírodné sedimenty z konkrétneho zdroja nemusia byť k dispozícii po celý rok a autochtónne organizmy, ako aj prítomnosť mikropolutantov môžu ovplyvniť test, prednostne by sa mal používať umelo pripravený sediment (známy aj pod názvom rekonštituovaný, umelý alebo syntetický sediment). Použitie umelo pripraveného sedimentu minimalizuje variabilitu testovacích podmienok, ako aj zavedenie autochtónnej fauny. Uvedený umelo pripravený sediment je založený na umelom sedimente podľa literatúry (6), (39) a (40). Odporúča sa na typ testov podľa literatúry (6), (10), (30), (41), (42), (43):

    a) 4 – 5 % (suchá hmotnosť) rašeliny; dôležité je používať rašelinu vo forme prášku, stupeň rozkladu: „stredný“, jemne drvenú (veľkosť častíc ≤ 0,5 mm) a sušenú iba vzduchom;

    b) 20 % ± 1 % (suchá hmotnosť) kaolínovej hliny (obsah kaolinitu podľa možnosti nad 30 %);

    c) 75 – 76 % (suchá hmotnosť) kremenného piesku (jemný piesok, veľkosť zrniek: ≤ 2 mm, ale > 50 % častíc by malo mať veľkosť v rozsahu 50 – 200 μm);

    d) deionizovaná voda, 30 – 50 % suchej hmotnosti sedimentu, okrem zložiek suchého sedimentu;

    e) uhličitan vápenatý chemicky čistej kvality ($CaCO_3$) sa pridáva, aby sa upravila hodnota pH konečnej zmesi sedimentu;

    f) celkový obsah organického uhlíka (TOC) v konečnej zmesi by mal byť 2 % (± 0,5 %) suchej hmotnosti sedimentu a mal by sa upraviť pomocou primeraného množstva rašeliny a piesku podľa písmen a) a c);

    g) potrava, napríklad sušené listy pŕhľavy dvojdomej (rod *Urtica*, v súlade s farmaceutickými normami, na ľudskú spotrebu), alebo zmes sušených listov rodu *Urtica* s alfa celulózou (1: 1), pri 0,4 – 0,5 % suchej hmotnosti sedimentu, okrem zložiek suchého sedimentu; podrobnosti sú uvedené v dodatku 4.

23. Zdroj rašeliny, kaolínovej hliny, potravy a piesku by mal byť známy. Okrem písmena g) sa aj v kapitole C.27 tejto prílohy (6) uvádzajú alternatívne rastlinné materiály, ktoré sa majú použiť ako zdroj výživy: dehydrované listy moruše (*Morus alba*), ďateliny plazivej (*Trifolium repens*), špenátu (*Spinacia oleracea*) alebo obilných tráv.

24. Zvolený zdroj potravy by sa mal pridať pred obohacovaním sedimentu testovanou chemikáliou alebo počas neho. Zvolený zdroj potravy by mal umožniť prinajmenšom prijateľnú reprodukciu v kontrolnej vzorke. Analýza umelého sedimentu alebo jeho zložiek na mikropolutanty by mohla pred použitím poskytnúť užitočné informácie. Príklad prípravy umelo pripraveného sedimentu je opísaný v dodatku 4. Prijateľné je tiež zmiešanie suchých zložiek, ak sa preukáže, že po pridaní nadložnej vody nedochádza k oddeleniu zložiek sedimentu (napr. vyplavením častíc rašeliny) a že rašelina alebo sediment prejde dostatočným kondicionovaním (pozri tiež bod 25 a dodatok 4). V prípade umelého sedimentu by mal byť známy prinajmenšom pôvod zložiek, rozdelenie veľkosti častíc (percento piesku, siltu a hliny), celkový obsah organického uhlíka, obsah vody a hodnota pH. Meranie oxidačno-redukčného potenciálu je nepovinné.

25. V prípade potreby, napríklad na špecifické testovacie účely, môžu slúžiť na testovanie a/alebo kultivovanie sedimentu aj prírodné sedimenty z neznečistených lokalít (3). Ak sa však použije prírodný sediment, mal by byť známy prinajmenšom jeho pôvod (miesto odberu), hodnota pH a obsah amoniaku vo vode obsiahnutej v póroch, celkový obsah organického uhlíka a obsah dusíka, rozdelenie veľkosti častíc (percento piesku, siltu a hliny) a percentuálny obsah vody (7), a nemal by obsahovať žiadne kontaminanty ani iné

▼M6

organizmy, ktoré by mohli súperiť s testovanými organizmami alebo na nich koristiť. Meranie oxidačno-redukčného potenciálu a kapacity výmeny katiónov je nepovinné. Odporúča sa tiež, aby bol prírodný sediment pred obohatením testovanou chemikáliou na sedem dní uvedený do podmienok, ktoré budú prevládať v nasledujúcom teste. Na konci tohto obdobia kondicionovania by sa mala nadložná voda odobrať a odstrániť.

26. Sediment, ktorý sa má použiť, musí mať takú kvalitu, aby umožnil prežívanie a reprodukciu organizmov v kontrolných vzorkách počas trvania expozície bez toho, že by sa prejavil ich nezvyčajný vzhľad alebo správanie. Červy v kontrolných vzorkách by sa mali zahrabať do sedimentu a mali by sediment požívať. Reprodukcia v kontrolných vzorkách by mala dosahovať prinajmenšom hodnoty podľa kritérií platnosti opísaných v bode 13. Prítomnosť alebo neprítomnosť fekálnych peliet na povrchu sedimentu, ktorá je ukazovateľom požívania sedimentu červami, je potrebné zaznamenať a môže pomôcť pri interpretácii výsledkov testu vo vzťahu k spôsobom expozície. Doplnkové informácie o požívaní sedimentu je možné získať použitím metód opísaných v literatúre (24), (25), (44) a (45), ktoré špecifikujú požívanie sedimentu alebo výber častíc v testovaných organizmoch.

27. Postupy manipulácie s prírodnými sedimentmi ešte pred ich použitím v laboratóriu sú opísané v literatúre (3), (7), (12). Príprava a skladovanie umelého sedimentu, ktorého použitie sa odporúča v prípade testu s červami rodu *Lumbriculus*, sú opísané v dodatku 4.

Aplikácia testovanej chemikálie

28. Testovaná chemikália sa pridá do sedimentu. Keďže v prípade väčšiny testovaných chemikálií sa predpokladá nízka rozpustnosť vo vode, pri príprave zásobného roztoku by sa mali rozpustiť vo vhodnom organickom rozpúšťadle (napr. v acetóne, n-hexáne, cyklohexáne) s čo najmenším objemom. Zo zásobného roztoku by sa mali pripraviť testovacie roztoky zriedením s rovnakým rozpúšťadlom. Toxicita a prchavosť rozpúšťadla, ako aj rozpustnosť testovanej chemikálie vo vybratom rozpúšťadle by mali byť hlavnými kritériami pri výbere vhodného činidla zvyšujúceho rozpustnosť. Pre každú úroveň koncentrácie by sa mal použiť rovnaký objem príslušného roztoku. Sediment by sa mal obohatiť hromadne pre každú úroveň koncentrácie s cieľom minimalizovať variabilitu medzi replikátmi každej úrovne koncentrácie testovanej chemikálie. Každý testovací roztok sa následne zmieša s kremenným pieskom, ako je opísané v bode 22 (napr. 10 g kremenného piesku na jednu testovaciu nádobu). Na to, aby kremenný piesok úplne nasiakol, postačuje objem 0,20 – 0,25 ml roztoku/g piesku. Rozpúšťadlo sa musí následne odpariť do sucha. S cieľom minimalizovať straty testovanej chemikálie pri odparovaní (napr. v závislosti od tlaku pár chemikálie) by sa pokrytý piesok mal použiť ihneď po vysušení. Suchý piesok sa zmieša s vhodným množstvom umelo pripraveného sedimentu zodpovedajúcej úrovne koncentrácie. Množstvo piesku použitého pri príprave zmesi s testovanou chemikáliou sa musí brať do úvahy pri príprave sedimentu (t. j. sediment by sa mal pripraviť s menším množstvom piesku). Hlavnou výhodou tohto postupu je skutočnosť, že do sedimentu sa nedostane prakticky žiadne rozpúšťadlo (7). Alternatívne, napríklad pre pôdny sediment, je možné testovanú chemikáliu pridať obohatením vysušenej a jemne pomletej vzorky sedimentu, ako bolo opísané v prípade kremenného piesku, alebo zamiešaním testovanej chemikálie do mokrého sedimentu a následným odparením všetkého použitého činidla zvyšujúceho rozpustnosť. Je potrebné zabezpečiť, aby sa testovaná chemikália pridávaná do sedimentu dôkladne a rovnomerne distribuovala v sedimente. V prípade potreby je možné analyzovať čiastkové vzorky na potvrdenie cieľovej koncentrácie v sedimente

▼M6

a stanovenie stupňa homogenity. Na potvrdenie cieľovej koncentrácie v sedimente môže byť tiež užitočné analyzovať čiastkové vzorky testovacích roztokov. Keďže na nanášanie testovanej chemikálie na kremenný piesok sa použije rozpúšťadlo, pripraviť by sa mala kontrolná vzorka s rovnakým množstvom rozpúšťadla a testovacích sedimentov. Je potrebné zaznamenať metódu použitú na obohatenie a dôvody na výber konkrétneho postupu obohacovania, ak je iný než uvedené postupy. Metóda obohatenia sa môže prispôsobiť fyzikálno-chemickým vlastnostiam testovanej chemikálie, napríklad aby sa zabránilo stratám spôsobeným odparovaním počas obohacovania alebo vyvažovania. Ďalšie usmernenia o postupoch obohacovania sa uvádzajú v dokumente Environment Canada (1995) (46).

29. Keď je obohatený sediment pripravený, rozmiestnený do paralelných testovacích nádob a prekrytý testovacou vodou, je vhodné umožniť rozdelenie testovanej chemikálie zo sedimentu do vodnej fázy [napr. (3), (7), (9)]. To by sa podľa možnosti malo vykonať za rovnakých teplotných a prevzdušňovacích podmienok, aké sa použijú v teste. Primeraný čas vyvažovania závisí od konkrétneho sedimentu a chemikálie a môže trvať niekoľko hodín až dní a v zriedkavých prípadoch až niekoľko týždňov (štyri až päť týždňov) [napr. (27) (47)]. V rámci tohto testu sa na rovnovážny stav nečaká, ale odporúča sa vyvažovacie obdobie 48 hodín až sedem dní. Preto sa bude minimalizovať čas na degradáciu testovanej chemikálie. V závislosti od účelu štúdie, napríklad keď sa napodobňujú podmienky životného prostredia, obohatený sediment sa môže nechať vyvažovať alebo zrieť aj dlhší čas.

30. Na konci tohto vyvažovacieho obdobia, by sa mali odobrať vzorky na analýzu koncentrácie testovanej chemikálie, prinajmenšom z nadložnej vody a sedimentu, aspoň pri najvyššej koncentrácii a jednej nižšej koncentrácii. Toto analytické skúmanie testovanej látky by malo umožniť výpočet hmotnostnej bilancie a vyjadrenie výsledkov na základe meraných počiatočných koncentrácií. Odoberanie vzoriek vo všeobecnosti narúša alebo ničí systém sedimentu a vody. Preto zvyčajne nie je možné použiť rovnaké replikáty na odber vzoriek sedimentu a červov. Je potrebné pripraviť doplnkové „analytické“ nádoby vhodných rozmerov, s ktorými sa zaobchádza rovnakým spôsobom (vrátane prítomnosti testovaných organizmov), ale ktoré sa nepoužijú na biologické pozorovania. Rozmery nádob by sa mali zvoliť tak, aby umožňovali vytvorenie vzoriek dostatočne veľkých pre potreby analytickej metódy. Podrobné informácie o odbere vzoriek sú uvedené v bode 53.

VYKONANIE TESTU

Predbežná skúška

31. Ak nie sú dostupné žiadne informácie o toxicite testovanej chemikálie voči druhu *Lumbriculus variegatus*, môže byť užitočné vykonať predbežnú skúšku s cieľom určiť rozsah koncentrácií, ktoré sa majú testovať v rámci konečného testu, a optimalizovať podmienky konečného testu. Na tento účel sa použije súbor koncentrácií testovanej látky s veľkými rozstupmi. Červy sú vystavené každej koncentrácii testovanej chemikálie na určité obdobie (napr. 28 dní ako v rámci konečného testu), ktoré umožňuje odhad vhodných testovacích koncentrácií, pričom sa nevyžadujú žiadne replikáty. Počas predbežného testu je potrebné pozorovať a zaznamenávať správanie červov, napríklad vyhýbanie sa sedimentu, čo môže byť spôsobené testovanou chemikáliou a/alebo sedimentom. Koncentrácie vyššie ako 1 000 mg/kg suchej hmotnosti sedimentu by sa nemali testovať v rámci predbežného testu.

Konečný test

32. V rámci konečného testu by sa malo použiť najmenej päť koncentrácií, ktoré sa zvolia napríklad na základe výsledkov predbežnej skúšky na vyhľadávanie rozsahu (bod 31), ako je uvedené v bodoch 35, 36, 37 a 38.

▼M6

33. Okrem testovacích sérií sa pripravujú kontrolné vzorky (používanie replikátov je opísané v bodoch 36, 37 a 38), ktoré obsahujú všetky zložky okrem testovanej chemikálie. Ak sa pri aplikácii testovanej chemikálie použije činidlo zvyšujúce rozpustnosť, nemalo by mať žiadny významný vplyv na testované organizmy, čo preukážu doplnkové kontrolné vzorky iba s rozpúšťadlom.

Koncepcia testu

34. Koncepcia testu sa vzťahuje na výber počtu a rozstupu testovacích koncentrácií, počtu nádob pre každú koncentráciu a počtu červov vložených do každej nádoby. Koncepcie odhadu koncentrácií EC_x, NOEC a vykonania limitného testu sú opísané v bodoch 35, 36, 37 a 38.

35. Účinná koncentrácia (napr. EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) a rozsah koncentrácií, v ktorom sa skúmajú účinky testovanej chemikálie, by mali byť v rozsahu koncentrácií použitých v rámci testu. Je potrebné sa vyhnúť extrapolácii hlboko pod najnižšou koncentráciou, ktorá ovplyvňuje testovaný organizmus, alebo nad najvyššou testovacou koncentráciou. Ak sa vo výnimočných prípadoch takáto extrapolácia vykoná, musí sa v správe uviesť úplné vysvetlenie.

36. Ak sa má odhadnúť koncentrácia EC_x, malo by sa testovať najmenej päť koncentrácií a minimálne tri replikáty na každú koncentráciu. Pre kontrolné vzorky a kontrolné vzorky s rozpúšťadlom, ak sa použijú, sa odporúča šesť replikátov s cieľom zlepšiť odhad variability kontrolných vzoriek. V každom prípade je vhodné použiť dostatočné testovacie koncentrácie, ktoré umožnia dobrý modelový odhad. Faktor rozstupu medzi koncentráciami by nemal byť vyšší ako dva (v prípadoch, keď má krivka závislosti reakcie od koncentrácie plytký sklon, je možné urobiť výnimku). Počet replikátov pri každej aplikácii testovanej chemikálie sa môže znížiť, ak sa zvýši počet testovacích koncentrácií s reakciou v rozsahu 5 – 95 %. Zvýšenie počtu replikátov alebo zúženie intervalov testovacích koncentrácií zvyčajne vedie k užším intervalom spoľahlivosti testu.

37. Ak sa majú odhadnúť hodnoty koncentrácie LOEC/NOEC, malo by sa použiť najmenej päť testovacích koncentrácií s minimálne štyrmi replikátmi (pre kontrolné vzorky a kontrolné vzorky s rozpúšťadlom, ak sa použijú, sa odporúča šesť replikátov s cieľom zlepšiť odhad variability kontrolných vzoriek) a faktor rozstupu medzi koncentráciami by nemal byť vyšší ako dva. Niektoré informácie o štatistickej významnosti, zistené počas testovania hypotézy v rámci kruhového testu testovacej metódy, sú uvedené v dodatku 6.

38. Môže sa vykonať limitný test (s použitím jednej testovacej koncentrácie a kontrolnej vzorky), ak sa neočakávajú žiadne účinky až do koncentrácie 1 000 mg/kg suchej hmotnosti sedimentu (napr. na základe predbežnej skúšky na vyhľadávanie rozsahu), alebo ak testovanie s jednou koncentráciou bude dostatočné na potvrdenie zisťovanej hodnoty NOEC. V druhom uvedenom prípade by sa do protokolu o skúške malo uviesť podrobné zdôvodnenie výberu hraničnej koncentrácie. Účelom limitného testu je vykonať test pri dostatočne vysokej koncentrácii, ktorá umožní subjektom zodpovedným za rozhodovanie vylúčiť možné toxické účinky testovanej chemikálie a stanoviť hraničnú hodnotu koncentrácie, ktorej výskyt sa neočakáva v žiadnej situácii. Odporúča sa hodnota 1 000 mg/kg (suchej hmotnosti). Zvyčajne je pre vzorky s aplikovanou chemikáliou aj pre kontrolné vzorky potrebných najmenej šesť replikátov. Niektoré informácie o štatistickej významnosti, zistené počas testovania hypotézy v rámci kruhového testu testovacej metódy, sú uvedené v dodatku 6.

Podmienky expozície

Testované organizmy

39. Test sa vykonáva s počtom minimálne desať červov na každý replikát používaný na stanovenie biologických parametrov. Tento počet červov zodpovedá približne 50 – 100 mg čerstvej biomasy. Za predpokladu obsahu sušiny 17,1 % (48) to znamená približne 9 – 17 mg suchej biomasy na jednu nádobu. V norme U.S. EPA (2000) (7) sa odporúča používať veľkosť

▼M6

náplne nepresahujúcu pomer 1: 50 (suchá biomasa: TOC). V prípade umelo pripraveného sedimentu, opísaného v bode 22, to zodpovedá približne 43 g sedimentu (suchá hmotnosť) na 10 červov pri celkovom obsahu TOC 2,0 % suchého sedimentu. V prípadoch, keď sa používa viac ako desať červov na jednu nádobu, by sa malo zodpovedajúcim spôsobom upraviť množstvo sedimentu a nadložnej vody.

40. Červy použité v teste by mali pochádzať z toho istého zdroja a mali by to byť živočíchy v podobnom fyziologickom stave (pozri dodatok 5). Vyberať by sa mali červy podobnej veľkosti (pozri bod 39). Odporúča sa pred testom odvážiť čiastkovú vzorku dávky alebo zásoby červov s cieľom odhadnúť ich strednú hmotnosť.

41. Červy použité v teste sa odoberú z kultúry (podrobnosti sú uvedené v dodatku 5). Veľké (dospelé) živočíchy, ktoré nejavia príznaky nedávnej fragmentácie, sa presunú do sklenených misiek (napr. Petriho misiek) obsahujúcich čistú vodu. Následne sa synchronizujú, ako je opísané v dodatku 5. Po regenerácii v trvaní 10 – 14 dní by sa neporušené úplné červy podobnej veľkosti, ktoré po jemných mechanických podnetoch aktívne plávajú alebo lezú, mali použiť na testovanie. Ak sa podmienky testu líšia od podmienok kultivácie (napr. teplotou, svetelným režimom a nadložnou vodou), fáza aklimatizácie napríklad 24 hodín pri teplote, svetelnom režime a použití rovnakej nadložnej vody ako v rámci testu by mala postačovať, aby sa červy adaptovali na podmienky testu. Adaptované máloštetinavce by sa mali náhodne rozdeliť do testovacích nádob.

Kŕmenie

42. Keďže potrava sa pridáva do sedimentu pred aplikáciou testovanej chemikálie (alebo počas nej), červy sa počas testu ďalej nekŕmia.

Svetlo a teplota

43. Dĺžka fotoperiódy v kultúre a v rámci testu je zvyčajne 16 hodín (3), (7). Intenzita svetla by sa mala udržiavať na nízkej úrovni (napr. 100 – 500 lux), aby sa na povrchu sedimentu napodobňovali prírodné podmienky, a merať by sa mala najmenej raz počas trvania expozície. Teplota by mala byť počas celého testu 20 °C ± 2 °C. Počas jedného daného termínu merania by rozdiel v teplote medzi testovacími nádobami nemal byť vyšší ako ± 1 °C. Testovacie nádoby by mali byť náhodne umiestnené v testovacom inkubátore alebo testovacom priestore, napríklad s cieľom minimalizovať skreslenie reprodukcie v dôsledku umiestnenia nádoby.

Prevzdušňovanie

44. Nadložná voda v testovacích nádobách by sa mala jemne prevzdušňovať (napr. 2 až 4 bubliny za sekundu) prostredníctvom Pasteurovej pipety umiestnenej približne 2 cm nad povrchom sedimentu tak, aby sa minimalizovalo narušenie sedimentu. Treba dbať na to, aby koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesla pod 30 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka. Prívod vzduchu by sa mal kontrolovať a v prípade potreby upraviť najmenej raz denne v pracovné dni.

Meranie kvality vody

45. V nadložnej vode by sa mali merať tieto parametre kvality vody:

Teplota:	najmenej v jednej testovacej nádobe na každú úroveň koncentrácie a v jednej testovacej nádobe s kontrolnou vzorkou, raz týždenne a na začiatku a na konci expozície; ak je to možné, doplnkovo sa môže zaznamenať teplota v okolitom médiu (okolitý vzduch alebo vodný kúpeľ), napríklad v hodinových intervaloch

▼M6

Obsah rozpusteného kyslíka:	najmenej v jednej testovacej nádobe na každú úroveň koncentrácie a v jednej testovacej nádobe s kontrolnou vzorkou, raz týždenne a na začiatku a na konci expozície; vyjadrený v mg/l a % rozpustnosti vzdušného kyslíka (ASV)
Prívod vzduchu:	mal by sa kontrolovať najmenej raz denne v pracovné dni a v prípade potreby upraviť
pH:	najmenej v jednej testovacej nádobe na každú úroveň koncentrácie a v jednej testovacej nádobe s kontrolnou vzorkou, raz týždenne a na začiatku a na konci expozície
Celková tvrdosť vody:	najmenej v jednom replikáte kontrolnej vzorky a v jednej testovacej nádobe s najvyššou koncentráciou, na začiatku a na konci expozície; vyjadrený v mg/l $CaCO_3$
Celkový obsah amoniaku:	najmenej v jednom replikáte kontrolnej vzorky a v jednej testovacej nádobe na každú úroveň koncentrácie, na začiatku a na konci expozície a následne trikrát týždenne; vyjadrený v mg/l NH_4^+ alebo NH_3 alebo ako celkový amoniak.

Ak si meranie parametrov kvality vody vyžaduje odobratie významných vzoriek vody z nádob, môže byť vhodné vytvoriť samostatné nádoby na meranie kvality vody, aby sa nemenil objemový pomer vody a sedimentu.

Biologické pozorovania

46. Počas expozície by sa mali testovacie nádoby pozorovať s cieľom vizuálne posúdiť akékoľvek rozdiely v správaní červov (napr. vyhýbanie sa sedimentu, fekálne pelety viditeľné na povrch sedimentu) v porovnaní s kontrolnými vzorkami. Pozorovania je potrebné zaznamenať.

47. Na konci testu sa preskúma každý replikát (doplnkové nádoby určené na chemické analýzy môžu byť z preskúmania vylúčené). Vhodná metóda by sa mala použiť na vybratie všetkých červov z testovacej nádoby. Treba dbať na to, aby sa všetky červy vybrali nezranené. Jednou z možných metód je získanie červov zo sedimentu preosiatím. Použiť sa môže sito z nehrdzavejúcej ocele s vhodnou veľkosťou ôk. Väčšina nadložnej vody sa opatrne vyleje a zvyšný sediment s vodou sa pretrepe, aby vznikol kal, ktorý je možné preosiať cez sito. Ak sa použije sito s otvormi 500 μm, väčšina častíc sedimentu prejde sitom veľmi rýchlo. Celé preosiatie by sa však malo urobiť rýchlo, aby sa zabránilo červom vliezť do ôk sita, alebo cez ne preliezť. Ak sa použije sito s otvormi 250 μm, zabráni to červom vliezť do ôk sita, alebo cez ne preliezť. Je však potrebné dbať na to, aby na site zostalo čo najmenej častíc sedimentu. Preosiaty kal z každej nádoby replikátu sa môže preosiať druhýkrát, aby sa zabezpečilo vybratie všetkých červov. Alternatívnou metódou by mohlo byť zahriatie sedimentu uložením testovacích nádob do vodného kúpeľa s teplotou 50 – 60 °C. Červy opustia sediment a je možné ich vyzbierať z povrchu sedimentu pomocou hladkej pipety so širokým hrotom. Inou alternatívnou metódou by mohlo byť vytvoriť kal zo sedimentu a naliať ho na plytkú misku vhodnej veľkosti. Z plytkej vrstvy kalu sa červy môžu pozbierať pomocou oceľovej ihly alebo hodinárskej pinzety (použije sa skôr ako vidlička než ako kliešte, aby sa zabránilo poraneniu červov) a preniesť do čistej vody. Červy sa po oddelení z kalu sedimentu opláchnu v testovacom médiu a spočítajú.

48. Nezávisle od použitej metódy by laboratóriá mali preukázať, že ich zamestnanci sú schopní získať priemerne najmenej 90 % organizmov z celého

▼M6

sedimentu. Napríklad určitý počet testovaných organizmov by sa mohol vložiť do sedimentu kontrolnej vzorky alebo testovacej vzorky a po 1 hodine by sa mohli vybrať a bolo by možné posúdiť mieru ich opätovného získania (7).

49. Celkový počet žijúcich a mŕtvych jedincov na jeden replikát by sa mal zaznamenať a zhodnotiť. Za mŕtve sa považujú tieto skupiny červov:

a) nereagujú na jemný mechanický podnet;

b) objavujú sa známky rozkladu (v kombinácii s písm. a);

c) počet chýbajúcich červov.

Okrem toho sa živé červy môžu zaradiť do jednej z troch skupín:

a) veľké úplné červy (dospelé) bez regenerovaných častí tela;

b) úplné červy s regenerovanými svetlejšie sfarbenými časťami tela (t. j. novou zadnou časťou, novou prednou časťou alebo s novou prednou aj zadnou časťou);

c) neúplné červy (t. j. nedávno fragmentované červy s neregenerovanými časťami tela).

Tieto doplnkové pozorovania nie sú povinné, ale môžu sa použiť na doplňujúcu interpretáciu biologických výsledkov (napr. vysoký počet červov zaradených do skupiny c môže poukazovať na meškanie reprodukcie alebo regenerácie v danej vzorke s aplikovanou chemikáliou). Okrem toho, ak sa pozorujú rozdiely vo výzore (napr. poškodenia povrchu tela, edémové časti tela) medzi červami zo vzorky s aplikovanou chemikáliou a červami z kontrolnej vzorky, je potrebné ich zaznamenať.

50. Hneď po spočítaní/zhodnotení sa živé červy nájdené v každom replikáte preložia na suché, vopred zvážené a označené misky váh (jedna na každý replikát) a usmrtia sa pomocou kvapky etanolu na každú misku. Misky sa umiestnia do sušiacej piecky a pri teplote 100 °C ± 5 °C sa sušia celú noc, potom sa po ochladení v exsikátore odvážia a stanoví sa suchá hmotnosť červov (podľa možnosti v gramoch, najmenej na 4 desatinné miesta).

51. Okrem celkovej suchej hmotnosti sa môže stanoviť suchá hmotnosť bez popola, podľa opisu v literatúre (49), aby sa zohľadnili anorganické zložky pochádzajúce z požitého sedimentu a prítomné v tráviacom trakte červov

52. Množstvo biomasy sa určí ako celkové množstvo biomasy na jeden replikát vrátane dospelých a juvenilných červov. Pri stanovení množstva biomasy na replikát by sa nemali brať do úvahy mŕtve červy.

Overovanie koncentrácie testovanej chemikálie

Odber vzoriek

53. Vzorky na chemickú analýzu testovanej chemikálie by sa mali odobrať aspoň pri najvyššej koncentrácii a jednej nižšej koncentrácii, prinajmenšom na konci fázy vyvažovania (pred pridaním testovaných organizmov) a na konci testu. Na analýzu by sa mali odobrať prinajmenšom vzorky časti sedimentu a nadložnej vody. V rámci každého termínu odberu vzoriek by sa mali odobrať najmenej dve vzorky na matricu a na vzorku s aplikovanou chemikáliou. Jeden duplikát vzorky sa môže uložiť ako rezerva (ktorá sa bude analyzovať napríklad v prípade, že výsledok počiatočnej analýzy

▼M6

neleží v rozsahu ± 20 % od nominálnej koncentrácie). V prípade osobitných chemických vlastností, napríklad ak sa očakáva rýchla degradácia testovanej chemikálie, sa na základe odborného posúdenia môže spresniť analytický harmonogram (napr. častejšie odbery vzoriek, analýza viacerých úrovní koncentrácie). Vzorky sa môžu odobrať v strednom termíne (napr. v 7. deň po začatí expozície).

54. Vzorka nadložnej vody by sa mala opatrne odobrať odliatím alebo odčerpaním tak, aby sa minimalizovalo narušenie sedimentu. Objem vzorky je potrebné zaznamenať.

55. Po odliatí nadložnej vody by sa mal sediment homogenizovať a preložiť do vhodnej nádoby. Hmotnosť vzorky mokrého sedimentu sa zaznamená.

56. Ak sa dodatočne požaduje analýza testovanej chemikálie v pórovej vode, je potrebné homogenizované a odvážené vzorky sedimentu odstrediť, aby sa získala pórová voda. Napríklad približne 200 ml mokrého sedimentu sa môže uložiť do odstreďovacej kadičky s objemom 250 ml. Potom by sa vzorky mali odstreďovať bez filtrácie, s cieľom izolovať pórovú vodu, napríklad 30 – 60 minút pri odstredivom zrýchlení 10 000 ± 600 × g a pri teplote nepresahujúcej teplotu používanú v rámci testu. Po odstredení sa supernatant opatrne vyleje alebo vyberie pipetou tak, aby v ňom nezostala žiadna častica sedimentu, a objem sa zaznamená. Zaznamená sa aj hmotnosť zostávajúcich peliet sedimentu. Tento údaj môže uľahčiť odhad hmotnostnej bilancie alebo výťažnosti testovanej chemikálie v systéme voda – sediment, ak sa suchá hmotnosť sedimentu určuje v každom termíne odberu vzorky. V niektorých prípadoch nemusí byť možné analyzovať koncentrácie v pórovej vode, lebo vzorka je príliš malá.

57. Ak sa analýza neurobí okamžite, všetky vzorky by sa mali skladovať vhodnou metódou, napríklad podľa podmienok skladovania odporúčaných na dosiahnutie minimálnej degradácie danej testovanej chemikálie (napr. environmentálne vzorky sa bežne skladujú v tme pri teplote – 18 °C). Pred začiatkom štúdie je potrebné získať informácie o vhodných podmienkach skladovania danej testovanej chemikálie – napríklad o trvaní a teplote skladovania, postupoch extrakcie atď.

Analytická metóda

58. Celý postup v zásade závisí od presnosti a citlivosti analytickej metódy použitej v prípade testovanej chemikálie, preto je potrebné experimentálne overiť, či sú presnosť a reprodukovateľnosť chemickej analýzy, ako aj výťažnosť testovanej chemikálie zo vzoriek sedimentu a vody pre danú metódu uspokojivé, aspoň pre najnižšiu a najvyššiu testovanú koncentráciu. Treba tiež overiť, či testovaná chemikália nie je prítomná v kontrolných komorách vo vyšších koncentráciách, ako je kvantifikačný limit. Ak je to potrebné, opraví sa hodnota nominálnej koncentrácie pre výťažnosť obohatených vzoriek na kontrolu kvality (napr. ak je výťažnosť mimo rozsahu 80 – 120 % obohateného množstva). So všetkými vzorkami by sa počas celého testu malo zaobchádzať tak, aby sa minimalizovala kontaminácia a strata (napr. v dôsledku adsorpcie testovanej chemikálie na zariadenie na odber vzoriek).

59. Výťažnosť testovanej chemikálie, kvantifikačný limit a limit detekcie v sedimente a vode by sa mali zaznamenať a uviesť v správe.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

60. Hlavné povinné premenné hodnoty reakcie v rámci testu, ktoré sa majú štatisticky hodnotiť, sú množstvo biomasy a celkový počet červov v jednom replikáte. Voliteľne by sa mohli hodnotiť aj reprodukcia (ako zvýšenie počtu červov) a rast (ako zvýšenie množstva suchej biomasy). V tomto prípade by sa mal získať odhad suchej hmotnosti červov na začiatku expozície, napríklad meraním suchej hmotnosti reprezentatívnej čiastkovej vzorky z dávky synchronizovaných červov, ktoré sa majú použiť v rámci testu.

▼M6

61. Hoci mortalita nie je parametrom tohto testu, mala by sa hodnotiť v najväčšej možnej miere. Pri odhadovaní mortality by sa za mŕtve mali považovať červy, ktoré nereagujú na jemný mechanický podnet alebo javia príznaky rozkladu, ako aj chýbajúce červy. Mortalita by sa mala zaznamenať a brať do úvahy pri interpretácii výsledkov testu.

62. Účinné koncentrácie by mali byť vyjadrené v mg/kg suchej hmotnosti sedimentu. Ak je výťažnosť testovanej chemikálie nameraná na začiatku expozície v sedimente alebo v sedimente a nadložnej vode 80 – 120 % nominálnej koncentrácie, účinné koncentrácie (EC_x, LOEC, NOEC) sa môžu vyjadriť na základe nominálnej koncentrácie. Ak sa výťažnosť odchyľuje od nominálnej koncentrácie o viac ako ± 20 % nominálnej koncentrácie, účinné koncentrácie (EC_x, LOEC, NOEC) by mali byť založené na koncentráciách pôvodne nameraných na začiatku expozície, napríklad pri zohľadnení hmotnostnej bilancie testovanej chemikálie v testovacom systéme (pozri bod 30). V takýchto prípadoch je možné získať doplnkové informácie z analýzy zásobných roztokov a/alebo aplikačných roztokov s cieľom potvrdiť, že testovacie sedimenty boli pripravené správne.

EC_x

63. Hodnoty EC_x pre parametre uvedené v bode 60 sa vypočítajú pomocou vhodných štatistických metód (napr. probitová analýza, logistická alebo Weibullova funkcia, upravená Spearman-Karberova metóda alebo jednoduchá interpolácia). Usmernenia o štatistickom hodnotení sú uvedené v literatúre (15) a (50). Koncentrácia EC_x sa získa zadaním hodnoty, ktorá zodpovedá x % strednej hodnoty nameranej v kontrolnej vzorke, do príslušnej rovnice. Pri výpočte EC_{50} alebo akejkoľvek inej hodnoty EC_x by sa mali stredné hodnoty pre každú vzorku s aplikovanou chemikáliou ($\bar{X}$) podrobiť regresnej analýze.

NOEC/LOEC

64. Ak je cieľom štatistickej analýzy stanovenie koncentrácie NOEC/LOEC, potrebné sú štatistické údaje pre každú nádobu (jednotlivé nádoby sa považujú za replikáty). Používať by sa mali vhodné štatistické metódy. Vo všeobecnosti sa nepriaznivé účinky testovanej chemikálie v porovnaní s kontrolnými vzorkami skúmajú pomocou jednostranného (obmedzeného) testovania hypotéz pri hodnote $p \leq 0,05$. Príklady sú uvedené v ďalších bodoch. Usmernenia k výberu vhodných štatistických metód sú uvedené v literatúre (15) a (50).

65. Normálne rozloženie údajov sa môže testovať napríklad Kolmogorovovým-Smirnovovým testom dobrej zhody, testom pomeru rozsahu k štandardnej odchýlke (R/s test) alebo Shapiro-Wilkovým testom (dvojstranný, $p \leq 0,05$). Na testovanie homogenity variancie sa môže použiť Cochranov test, Levenov test alebo Barlettov test (dvojstranný, $p \leq 0,05$). Ak sú splnené požiadavky postupov parametrických testov (normalita, homogenita variancie), môže sa vykonať jednostranná analýza variancie (ANOVA) a následné testy viacnásobného porovnania. Párové porovnania (napr. Dunnettov t-test) alebo testy zmiernenia trendu (napr. Williamsov test) sa môžu použiť na výpočet, či existujú výrazné rozdiely ($p \leq 0,05$) medzi kontrolnými vzorkami a vzorkami s rôznymi koncentráciami testovanej chemikálie. Inak by sa na stanovenie koncentrácií NOEC a LOEC mali použiť neparametrické metódy (napr. Bonferroniho U-test podľa Holma alebo Jonckheereho-Terpstrov test trendu).

Limitný test

66. Ak sa vykonal limitný test (porovnanie kontrolnej vzorky a len jednej vzorky s aplikovanou chemikáliou) a ak sú splnené požiadavky postupov parametrických testov (normalita, homogenita), metrické reakcie (celkový počet červov a množstvo biomasy ako suchá hmotnosť červov) je možné hodnotiť pomocou Studentovho testu (t-test). Ak tieto požiadavky nie sú splnené, je možné použiť t-test nerovnakej variancie (Welchov t-test) alebo neparametrický test, ako napríklad Mannov-Whitneyho U-test. Niektoré informácie o štatistickej významnosti, zistené počas testovania hypotézy v rámci medzilaboratórnej porovnávacej skúšky testovacej metódy, sú uvedené v dodatku 6.

▼M6

67. S cieľom určiť významné rozdiely medzi kontrolnými vzorkami (kontrolné vzorky a kontrolné vzorky s rozpúšťadlom) sa môžu replikáty každej kontrolnej vzorky testovať tak, ako je uvedené pre limitný test. V prípade, že sa týmito testami nezistia významné rozdiely, všetky replikáty kontrolných vzoriek a kontrolných vzoriek s rozpúšťadlom sa môžu spojiť. Inak by sa mali všetky vzorky s aplikovanou chemikáliou porovnať s kontrolnými vzorkami s rozpúšťadlom.

Interpretácia výsledkov

68. Výsledky by sa mali interpretovať opatrne, ak sa vyskytli odchýlky od tejto testovacej metódy, a v prípadoch, keď namerané hodnoty testovacích koncentrácií dosahujú úrovne blízke detekčným limitom použitej analytickej metódy. Všetky odchýlky od tejto testovacej metódy sa musia zaznamenať.

Protokol o skúške

69. Protokol o skúške by mal obsahovať prinajmenšom tieto informácie:

— *Testovaná chemikália:*

— identifikačné údaje chemikálie (bežný názov, chemický názov, štrukturálny vzorec, číslo CAS atď.) vrátane čistoty a analytickej metódy na kvantifikáciu testovanej chemikálie; zdroj testovanej chemikálie, identita a koncentrácia akéhokoľvek použitého rozpúšťadla,

— akékoľvek dostupné informácie o fyzikálnom charaktere a fyzikálno-chemických vlastnostiach, získané pred začiatkom testu (napr. rozpustnosť vo vode, tlak pary, rozdeľovacia konštanta v pôde (alebo v sedimente, ak je k dispozícii), log K_{ow}, stabilita vo vode atď.).

— *Testované druhy:*

— vedecký názov, pôvod, všetky zásahy uskutočnené pred testom, aklimatizácia, kultivačné podmienky atď.

— *Podmienky testu:*

— použitý postup testovania (napr. statický, semistatický alebo prietokový),

— koncepcia testu (napr. počet, materiál a veľkosť testovacích komôr, objem vody na jednu nádobu, hmotnosť a objem sedimentu na jednu nádobu, (pre prietokový alebo semistatický postup: rýchlosť výmeny celého objemu vody), akékoľvek prevzdušňovanie používané pred testom a počas neho, počet replikátov, počet červov v jednom replikáte na začiatku expozície, počet testovacích koncentrácií, dĺžka obdobia kondicionovania, vyvažovania a expozície, frekvencia odberov vzoriek),

— hĺbka sedimentu a nadložnej vody,

— metóda úpravy testovanej chemikálie pred testom a metóda obohatenia/aplikácie testovanej chemikálie,

— nominálne testovacie koncentrácie, podrobnosti týkajúce sa odberu vzoriek na chemickú analýzu a analytické metódy, ktorými sa získali hodnoty koncentrácie testovanej chemikálie,

— vlastnosti sedimentu, ako sú opísané v bodoch 24 a 25, a akékoľvek ďalšie vykonané merania, príprava umelo pripraveného sedimentu,

— príprava vody použitej na testovanie (ak sa použije rekonštituovaná voda) a jej vlastnosti (koncentrácia kyslíka, pH, vodivosť, tvrdosť a výsledky iných vykonaných meraní) pred začatím testu,

— podrobné informácie o kŕmení vrátane druhu potravy, prípravy, množstva a kŕmneho režimu,

▼**M6**

— intenzita svetla a dĺžka fotoperiódy, resp. fotoperiód,

— metódy použité na stanovenie všetkých biologických parametrov (napr. odber vzoriek, inšpekcie, váženie testovaných organizmov) a všetky abiotické parametre (napr. parametre kvality vody a sedimentu),

— objem a/alebo hmotnosť všetkých vzoriek na chemickú analýzu

— podrobné informácie o príprave všetkých vzoriek na chemickú analýzu vrátane údajov o príprave, skladovaní, postupoch obohacovania, extrakcii a analytických postupoch (a presnosti) testovanej chemikálie a výťažnosti testovanej chemikálie.

— *Výsledky:*

— kvalita vody v testovacích nádobách (pH, teplota, koncentrácia rozpusteného kyslíka, tvrdosť, koncentrácia amoniaku a výsledky iných vykonaných meraní),

— celkový obsah organického uhlíka (TOC), pomer suchej hmotnosti k čerstvej hmotnosti, pH sedimentu a výsledky iných vykonaných meraní,

— celkový počet červov a počet úplných a neúplných červov, ak je stanovený, v každej skúšobnej komore na konci testu,

— suchá hmotnosť červov v každej skúšobnej komore na konci testu a suchá hmotnosť čiastkovej vzorky červov na začiatku testu, ak sa meria,

— akékoľvek pozorované nenormálne správanie v porovnaní s kontrolnými vzorkami (napr. vyhýbanie sa sedimentu, prítomnosť alebo neprítomnosť fekálnych peliet),

— celková pozorovaná mortalita,

— odhady toxických konečných parametrov (napr. EC_x, NOEC a/alebo LOEC) a štatistické metódy použité na ich stanovenie,

— nominálne testovacie koncentrácie, namerané testovacie koncentrácie a výsledky všetkých analýz na stanovenie koncentrácie testovanej chemikálie v testovacích nádobách,

— akékoľvek odchýlky od kritéria platnosti.

— *Hodnotenie výsledkov:*

— súlad výsledkov s kritériami platnosti uvedenými v bode 13,

— rozbor výsledkov vrátane každého vplyvu na výsledok testu vyplývajúceho z odchýlok od tejto testovacej metódy.

LITERATÚRA

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. Chapter C.27 of this Annex, „Sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment".

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 ^{14}C-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. Chapter C.1 of this Annex, Fish, Acute Toxicity Test.

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.

Doplnková literatúra týkajúca sa štatistických postupov:

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

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov

Na účely tejto testovacej metódy sa používa toto vymedzenie pojmov:

Chemikália je látka alebo zmes.

Obdobie kondicionovania sa využíva na stabilizovanie mikrobiálnej zložky sedimentu a na odstránenie napríklad amoniaku pochádzajúceho zo zložiek sedimentu; predchádza obohacovaniu sedimentu testovanou chemikáliou. Po kondicionovaní sa nadložná voda zvyčajne odstráni.

EC_x je koncentrácia testovanej chemikálie v sedimente, ktorá v rámci stanoveného času expozície vyvolá účinok x % (napr. 50 %) na biologický parameter.

Obdobie vyvažovania umožňuje rozdelenie testovanej chemikálie medzi tuhú fázu, vodu nachádzajúcu sa v interstíciu sedimentu a nadložnú vodu; prebieha po obohatení sedimentu testovanou chemikáliou a pred pridaním testovaných organizmov.

Fáza expozície je čas, v priebehu ktorého sú testované organizmy vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie.

Umelo pripravený sediment alebo rekonštituovaný, umelý či syntetický sediment je zmes materiálov použitých na napodobnenie fyzických zložiek prírodného sedimentu.

Najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC) je najnižšia testovacia koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej sa pozoruje, že chemikália má významný toxický účinok (pri $p \leq 0,05$) v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Škodlivý účinok všetkých testovacích koncentrácií nad LOEC však musí byť rovnaký alebo väčší ako účinky pozorované pri LOEC. Ak nie sú splnené tieto dve podmienky, je potrebné poskytnúť úplné vysvetlenie, akým spôsobom sa zvolila koncentrácia LOEC (a teda aj koncentrácia NOEC).

Koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC) je testovacia koncentrácia bezprostredne pod koncentráciou LOEC, ktorá v porovnaní s kontrolnou vzorkou nemá žiadny štatisticky významný účinok ($p \leq 0,05$) v rámci daného času expozície.

Rozdeľovacia konštanta oktanol – voda (K_{ow}, niekedy označovaný aj P_{ow}) je pomer rozpustnosti chemikálie v n-oktanole a vo vode v rovnovážnom stave a predstavuje lipofilitu chemikálie (kapitola A.24 tejto prílohy). Parameter K_{ow} alebo logaritmus K_{ow} ($\log K_{ow}$) sa používa na vyjadrenie potenciálu chemikálie na bioakumuláciu vo vodných organizmoch.

Rozdeľovacia konštanta organický uhlík – voda (K_{oc}) je pomer koncentrácie chemikálie vo/na frakcii sedimentu tvorenej organickým uhlíkom a koncentrácie chemikálie vo vode v rovnovážnom stave.

Nadložná voda je voda umiestnená v testovacej nádobe nad sedimentom.

Pórová voda alebo intersticiálna voda je voda nachádzajúca sa v póroch sedimentu alebo pôdy.

Obohatený sediment je sediment, do ktorého bola pridaná testovaná chemikália.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

▼M6

Dodatok 2

Zloženie odporúčanej rekonštituovanej vody

(prevzaté z kapitoly C.1 tejto prílohy 1)

a) *Roztok chloridu vápenatého*

Rozpustite 11,76 g $CaCl_2 \times 2H_2O$ v deionizovanej vode; doplňte deionizovanou vodou na 1 liter.

b) *Roztok síranu horečnatého*

Rozpustite 4,93 g $MgSO_4 \times 2H_7O$ v deionizovanej vode; doplňte deionizovanou vodou na 1 liter.

c) *Roztok hydrouhličitanu sodného*

Rozpustite 2,59 g $NaHCO_3$ v deionizovanej vode; doplňte deionizovanou vodou na 1 liter.

d) *Roztok chloridu draselného*

Rozpustite 0,23 g KCl v deionizovanej vode; doplňte deionizovanou vodou na 1 liter.

Všetky chemikálie musia byť analytickej čistoty.

Vodivosť destilovanej alebo deionizovanej vody nesmie prekročiť hodnotu 10 μScm^{-1}.

Zmieša sa 25 ml každého z roztokov a) až d) a doplní sa deionizovanou vodou na celkový objem 1 liter. Celkové množstvo iónov vápnika a horčíka v tomto roztoku je 2,5 mmol/l.

Pomer iónov Ca: Mg je 4: 1 a pomer iónov Na: K je 10: 1. Kyselinová kapacita $K_{S4.3}$ tohto roztoku je 0,8 mmol/l.

Rozpúšťacia voda sa prevzdušňuje, pokiaľ sa nedosiahne nasýtenie kyslíkom, potom sa pred použitím uskladní približne na dva dni bez ďalšieho prevzdušňovania.

LITERATÚRA

(1) Chapter C.1 of this Annex, Fish Acute Toxicity Test.

▼**M6**

Dodatok 3

Fyzikálno-chemické vlastnosti vody vhodnej na riedenie

Zložka	Koncentrácie
Tuhé častice	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 µg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Zvyškový chlór	< 10 µg/l
Celkové pesticídy na báze organofosfátov	< 50 ng/l
Celkové organochlórované pesticídy plus polychlórované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlór	< 25 ng/l
[prevzaté z OECD (1992) (1)]	

LITERATÚRA

1. OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

▼M6

Dodatok 4

Odporúčaný umelý sediment – usmernenia na prípravu a skladovanie

Zložky sedimentu

Zložka	Charakteristika	% sušiny v sedimente
Rašelina	rašelina s machom z rašelinníka, stupeň rozkladu: „stredný“, sušená vzduchom, žiadne viditeľné zvyšky rastlín, jemne rozomletá (veľkosť častíc ≤0,5 mm)	5 ± 0,5
Kremenný piesok	veľkosť zrniek: ≤ 2 mm, ale > 50 % častíc by malo mať veľkosť v rozsahu 50 – 200 μm);	75 – 76
Kaolínová hlina	obsah kaolinitu ≥ 30 %	20 ± 1
Zdroj potravy	napr. rozomleté listy žihľavy obyčajnej (Folia urticae), listy přhľavy dvojdomej (Urtica dioica), jemne rozomleté (veľkosť častíc ≤0,5 mm); v súlade s farmaceutickými normami, na ľudskú spotrebu; navyše k suchému sedimentu	0,4 – 0,5 %
Organický uhlík	upravený pridaním rašeliny a piesku	2 ± 0,5
Uhličitan vápenatý	$CaCO_3$, práškový, chemicky čistý, navyše k suchému sedimentu	0,05 – 1
Deionizovaná voda	vodivosť ≤ 10 μS/cm, navyše k suchému sedimentu	30 – 50

Poznámka: Ak sa predpokladá výskyt zvýšených koncentrácií amoniaku, napríklad ak je testovaná chemikália známym inhibítorom nitrifikácie, môže byť užitočné nahradiť 50 % prášku žihľavy, bohatej na dusík, celulózou [napr. prášková α-celulóza, chemicky čistá, veľkosť častíc ≤ 0,5 mm (1) (2)].

Príprava

Rašelina sa usuší vzduchom a rozomelie na jemný prášok. V deionizovanej vode sa pomocou vysokovýkonného homogenizačného prístroja pripraví suspenzia požadovaného množstva rašelinového prášku. Hodnota pH tejto suspenzie sa pomocou $CaCO_3$ upraví na 5,5 ± 0,5. Suspenzia sa najmenej dva dni nechá kondicionovať s jemným premiešavaním pri teplote 20 ± 2 °C, aby sa stabilizovala hodnota pH a vytvorila stabilná mikrobiálna zložka. Opäť sa zmeria hodnota pH, ktorá by mala byť na úrovni 6,0 ± 0,5. Rašelinová suspenzia sa následne zmieša s ostatnými zložkami (piesok a kaolínová hlina) a s deionizovanou vodou, aby sa získal homogénny sediment s obsahom vody v rozsahu 30 – 50 percent sušiny v sedimente. Znova sa zmeria hodnota pH konečnej zmesi a podľa potreby sa pomocou $CaCO_3$ upraví na 6,5 – 7,5. Ak sa však očakáva vyvíjanie amoniaku, môže byť užitočné udržiavať hodnotu pH sedimentu pod 7,0 (napr. medzi 6,0 a 6,5). Odoberú sa vzorky sedimentu, aby sa stanovila suchá hmotnosť a obsah organického uhlíka. Ak sa však očakáva vyvíjanie amoniaku, umelo pripravený sediment sa môže kondicionovať sedem dní za rovnakých podmienok, aké budú prevládať v následnom teste (napr. pomer sediment – voda 1: 4, výška vrstvy sedimentu ako v testovacích nádobách), pred tým, ako bude obohatený

▼M6

testovanou chemikáliou, t. j. mal by sa prekryť vrstvou vody, ktorá sa bude prevzdušňovať. Na konci obdobia kondicionovania by sa mala nadložná voda odobrať a odstrániť. Následne sa obohatený kremenný piesok zmieša so sedimentom pre každú úroveň aplikovanej chemikálie, sediment sa rozdelí do paralelných testovacích nádob a prekryje testovacou vodou. Nádoby sa potom inkubujú za rovnakých podmienok, aké budú prevládať v následnom teste. Tu sa začína obdobie vyvažovania. Nadložná voda by sa mala prevzdušňovať.

Zvolený zdroj potravy by sa mal pridať pred obohacovaním sedimentu testovanou chemikáliou alebo počas neho. Na začiatku sa môže zmiešať s rašelinovou suspenziou (pozri vyššie). Nadmernému rozkladu zdroja potravy ešte pred pridaním testovaných organizmov, napríklad v prípade dlhého obdobia vyvažovania, je možné predísť tým, že obdobie medzi pridaním potravy a začiatkom expozície bude čo najkratšie. S cieľom zabezpečiť, aby bola potrava obohatená testovanou chemikáliou, by sa zdroj potravy mal zmiešať so sedimentom najneskôr v deň, keď sa sediment obohatí testovanou chemikáliou.

Skladovanie

Suché zložky umelého sedimentu sa môžu skladovať na suchom, chladnom mieste alebo pri teplote miestnosti. Umelo pripravený sediment obohatený testovanou chemikáliou by sa mal použiť v rámci testu okamžite. Vzorky obohateného sedimentu sa môžu skladovať v podmienkach odporúčaných pre konkrétnu testovanú chemikáliu až do analýzy.

LITERATÚRA

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

Dodatok 5

Metódy kultivácie druhu *Lumbriculus variegatus*

Červ druhu *Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), čeľade *Lumbriculidae*, triedy *Oligochaeta* je obyvateľom sladkovodných sedimentov a široko sa využíva v ekotoxikologickom testovaní. Ľahko sa kultivuje v laboratórnych podmienkach. V nasledujúcom texte je uvedený prehľad metód kultivácie.

Metódy kultivácie

Kultivačné podmienky pre druh *Lumbriculus variegatus* sú podrobne vysvetlené v prácach Phipps a kol. (1993) (1), Brunson a kol. (1998) (2), ASTM (2000) (3), U.S. EPA (2000) (4). Stručné zhrnutie týchto podmienok je uvedené nižšie. Hlavnou výhodou druhu *L. variegatus* je jeho rýchla reprodukcia, čo vedie k rýchlemu nárastu množstva biomasy populácií kultivovaných v laboratóriu [napr. (1), (3), (4), (5)].

Červy je možné kultivovať vo veľkých akváriách (57 – 80 l), pri teplote 23 °C, s fotoperiódou 16 h svetla: 8 h tmy (pri intenzite osvetlenia 100 – 1 000 luxov), s použitím denne obnovovanej prírodnej vody (45 – 50 l na akvárium). Substrát sa pripraví postrihaním nebielených hnedých papierových utierok na pásiky, ktoré sa potom môžu na niekoľko sekúnd zmiešať s kultivačnou vodou, aby vznikol substrát malých kúskov papiera. Tento substrát sa potom môže priamo použiť v akváriu určenom na kultivovanie dážďovičiek *Lumbriculus* tak, že sa ním pokryje dno nádrže, alebo sa uskladní zmrazený v deionizovanej vode na neskoršie použitie. Nový substrát vo všeobecnosti vydrží v nádrži približne dva mesiace.

Každá kultivácia červov sa začína s 500 – 1 000 červami, ktoré sa kŕmia 10 ml suspenzie obsahujúcej 6 g pstruhov ako štartovaciu potravu, trikrát týždenne v podmienkach obnovy alebo prietokového systému. Statické alebo semistatické kultúry by sa mali kŕmiť menšími dávkami, aby sa predišlo rastu baktérií a húb.

Za týchto podmienok sa počet jedincov v rámci kultúry vo všeobecnosti zdvojnásobí počas približne 10 až 14 dní.

Alternatívne sa druh *Lumbriculus variegatus* môže kultivovať aj v systéme pozostávajúcom z vrstvy kremenného piesku, ktorý sa používa ako umelý sediment (hĺbka 1 – 2 cm) a rekonštituovanej vody. Ako kultivačné nádoby sa môžu použiť nádoby zo skla alebo z nerezovej ocele, s výškou 12 – 20 cm. Vrstva vody by sa mala jemne prevzdušňovať (napr. dve bubliny za sekundu) prostredníctvom Pasteurovej pipety umiestnenej približne 2 cm nad povrchom sedimentu. S cieľom zabrániť nahromadeniu napríklad amoniaku by sa nadložná voda mala vymieňať pomocou prietokového systému, alebo aspoň raz za týždeň ručne. Máloštetinavce je možné držať pri teplote miestnosti s fotoperiódou 16 hodín svetla (s intenzitou osvetlenia 100 – 1 000 lx) a 8 hodín tmy. V semistatickej kultúre (obnova vody raz za týždeň) sa červy kŕmia dvakrát týždenne potravou pre ryby TetraMin (napr. 0,6 – 0,8 mg/cm^2 povrchu sedimentu), ktorá sa môže aplikovať ako suspenzia 50 mg TetraMin na každý ml deionizovanej vody.

Červy druhu *Lumbriculus variegatus* sa môžu z kultúr vyberať napríklad prenosom substrátu pomocou jemného sita alebo organizmov pomocou sklenej hladkej pipety so širokým hrotom (s priemerom približne 5 mm), do oddelenej kadičky. Ak sa do tejto kadičky prenáša aj substrát, kadička obsahujúca červov a substrát sa cez noc nechá v prietokových podmienkach, čím sa odstráni z kadičky substrát, zatiaľ čo červy zostanú na dne nádoby. Tie sa potom môžu vložiť do novopripravených kultivačných nádrží, alebo ďalej spracúvať na test, ako je uvedené v literatúre (3) a (4), alebo v ďalšom texte.

Otázka, ktorú treba kriticky zvažovať pri použití druhu *L. variegatus* v rámci testovania v sedimentoch, je jeho spôsob reprodukcie [architómia alebo morfalaxia, napr. (6)]. Toto nepohlavné rozmnožovanie vedie ku vzniku dvoch fragmentov, ktoré počas určitého obdobia neprijímajú potravu, až kým sa hlavová alebo chvostová časť nezregeneruje [napr. (7), (8)]. To znamená, že v prípade druhu *L. variegatus* nedochádza k expozícii prostredníctvom požitia kontaminovaného sedimentu nepretržite.

▼M6

Preto by sa mala vykonávať synchronizácia s cieľom minimalizovať nekontrolovanú reprodukciu a regeneráciu a následne veľké rozdiely vo výsledkoch testov. Takéto rozdiely môžu vzniknúť, ak viacerí jedinci, ktorí sú fragmentovaní, a preto počas určitého obdobia neprijímajú potravu, sú menej vystavení pôsobeniu testovanej chemikálie ako ostatní jedinci, ktorí počas testu neprejdú fragmentáciou (9), (10), (11). Červy by sa mali umelo fragmentovať 10 – 14 dní pred začiatkom expozície (synchronizácia). Na synchronizáciu by sa mali prednostne vyberať veľké (dospelé) červy, ktoré nevykazujú príznaky nedávnej morfalaxie. Tieto červy sa môžu umiestniť na podložné sklíčko do kvapky kultivačnej vody a skalpelom rozdeliť v strednej časti tela. Treba dbať na to, aby zadné časti mali podobnú veľkosť. Zadné časti by sa potom mali do začiatku expozície nechať v kultivačných nádobách obsahujúcich rovnaký substrát, aký sa používa v kultúre, a rekonštituovanú vodu, na regeneráciu nových hlavových častí. Príznakom regenerácie nových hlavových častí je, keď sa synchronizované červy zahrabávajú do substrátu (prítomnosť regenerovaných hláv sa môže potvrdiť preskúmaním reprezentatívnej čiastkovej vzorky binokulárnym mikroskopom). Očakáva sa, že testované organizmy budú potom v podobnom fyziologickom stave. To znamená, že keď počas testu dôjde pri synchronizovaných červoch k reprodukcii morfalaxiou, predpokladá sa, že prakticky všetky živočíchy by mali byť rovnako vystavené pôsobeniu obohateného sedimentu. Kŕmenie synchronizovaných červov by sa malo vykonať raz, hneď po tom, ako sa červy začnú zahrabávať do substrátu, alebo sedem dní po rozdelení. Režim kŕmenia by mal byť porovnateľný s riadnymi kultúrami, ale môže byť vhodné kŕmiť synchronizované červy tým istým zdrojom potravy, aký sa bude používať v rámci testu. Červy by sa mali držať pri testovacej teplote 20 °C ± 2 °C. Po regenerácii by sa na test mali použiť neporušené úplné červy podobnej veľkosti, ktoré po jemných mechanických podnetoch aktívne plávajú alebo lezú. Predchádzať by sa malo zraneniam alebo autotómii červov, napríklad používaním pipety s hladkými okrajmi alebo dentálnej pinzety z nehrdzavejúcej ocele na manipuláciu s týmito červami.

Zdroje štartovacích kultúr druhu Lumbriculus variegatus [adresy v USA sú prevzaté z literatúry (4)]

Európa

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Germany

Bayer Crop Science AG
Development – Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Germany

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finland

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Germany

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

USA

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

▼**M6**

U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

REFERENCES

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

Dodatok 6

Súhrn výsledkov medzilaboratórnej porovnávacej skúšky

„Test toxicity sedimentu s druhom *Lumbriculus variegatus*“

Tabuľka 1

Výsledky jednotlivých častí medzilaboratórnej porovnávacej skúšky: stredný počet červov v kontrolných vzorkách a v kontrolných vzorkách ošetrených rozpúšťadlom na konci testu. SD = štandardná odchýlka, CV = variačný koeficient

	Stredný počet červov v kontrolných vzorkách	SD	CV (%)	n	Stredný počet červov vo vzorkách ošetrených rozpúšťadlom	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
Medzilaboratórna stredná hodnota	**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**			
max.	**42,0**				**43,7**			
CV (%)	**28,1**				**24,7**			

▼**M6**

Tabuľka 2

Výsledky jednotlivých častí medzilaboratórnej porovnávacej skúšky: stredná celková suchá hmotnosť červov na jeden replikát v kontrolných vzorkách a v kontrolných vzorkách ošterených rozpúšťadlom na konci testu. SD = štandardná odchýlka, CV = variačný koeficient

	Celková suchá hmotnosť červov na replikát (kontrolné vzorky)	SD	CV (%)	n	Celková suchá hmotnosť červov na replikát (kontrolné vzorky ošetrené rozpúšťadlom)	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
Medzilaboratórna stredná hodnota	**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**			
max.	**41,3**				**41,4**			
CV (%)	**31,3**				**26,8**			

▼M6

Tabuľka 3

Toxicita PCP: súhrn konečných parametrov v medzilaboratórnej porovnávacej skúške; medzilaboratórne stredné hodnoty EC_{50}, NOEC a LOEC. SD = štandardná odchýlka, CV = variačný koeficient

Biologický parameter		Medzilaboratórna stredná hodnota	min.	max.	Medzilaboratórny faktor	SD	CV (%)	geometrický priemer (mg/kg)
celkový počet červov	**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				
Celková suchá hmotnosť červov	**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				
Mortalita/ prežitie	**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
Reprodukcia (zvýšenie počtu červov na replikát)	**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				
Rast (zvýšenie množstva biomasy na replikát)	**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: minimálny zistiteľný rozdiel oproti hodnotám kontrolných vzoriek pri testovaní hypotézy; používa sa na meranie štatistickej významnosti.

LITERATÚRA

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.

▼M6

C.36. REPRODUKČNÝ TEST S DRAVÝMI ROZTOČMI [*HYPOASPIS ACULEIFER* (*GEOLAELAPS*)] V PÔDE

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 226 (2008). Táto testovacia metóda je určená na odhadnutie účinkov chemikálií v pôde na reprodukčný výstup pôdnych dravých roztočov *Hypoaspis aculeifer (Geolaelaps)* Canestrini (*Acari*: čeľaď *Laelapidae*), a teda umožňuje odhad inhibície špecifickej rýchlosti rastu populácie (1), (2). Reprodukčný výstup tu znamená počet juvenilných jedincov na konci testovacieho obdobia. Roztoče druhu *H. aculeifer* predstavujú doplnok tropickej úrovne k druhom, pre ktoré sú testovacie metódy už k dispozícii. Reprodukčný test bez diskriminácie a kvantifikácie rôznych fáz reprodukčného cyklu sa považuje za primeraný na účely tejto testovacej metódy. Pre chemické látky s iným expozičným scenárom, ako je expozícia prostredníctvom pôdy, by mohli byť vhodné iné prístupy (3).

2. Druh *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* sa považuje za relevantného predstaviteľa pôdnej fauny a najmä dravých roztočov. Je zastúpený na celom svete (5) a je možné ho ľahko zhromažďovať a chovať v laboratóriu. Súhrn venovaný biológii druhu *H. aculeifer* je uvedený v dodatku 7. Základné informácie o ekológii jednotlivých druhov roztočov a ich použití v ekotoxikologickom testovaní sú k dispozícii v literatúre (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

PRINCÍP SKÚŠKY

3. Dospelé samičky sú vystavené účinkom rôznych koncentrácií testovanej chemikálie zamiešanej do pôdy. Test sa začína s desiatimi dospelými samičkami na jednu paralelnú nádobu. Samčekovia nie sú v teste zahrnutí, lebo zo skúseností vyplynulo, že ak sú samčekovia prítomní, samičky sa pária ihneď alebo krátko po ukončení štádia deutonymfy. Okrem toho, začlenenie samčekov by predĺžilo test natoľko, že by bola potrebná namáhavá diskriminácia podľa štádií veku. Samotné párenie teda nie je súčasťou testu. Samičky sa synchronizovane zapoja do testu 28 – 35 dní po začiatku obdobia kladenia vajíčok (pozri dodatok 4), lebo vtedy je možné predpokladať, že samičky sú už spárené a že prešli štádiom predchádzajúcim kladeniu vajíčok. Pri teplote 20 °C sa test skončí v 14. deň po zapojení samičiek (0. deň), čo umožňuje prvej kontrolnej skupine potomkov dosiahnuť štádium deutonymfy (pozri dodatok 4). Ako hlavná meraná premenná hodnota sa stanoví počet juvenilných jedincov na jednu testovaciu nádobu a okrem toho počet samičiek, ktoré prežili. Reprodukčný výstup roztočov vystavených pôsobeniu testovanej chemikálie sa porovnáva s výsledkami kontrolných vzoriek s cieľom stanoviť hodnotu EC_x (napr. EC_{10}, EC_{50}) alebo koncentráciu bez pozorovaného účinku (NOEC) (pozri vymedzenie pojmov v dodatku 1), v závislosti od použitej koncepcie experimentu (pozri bod 29). Prehľad harmonogramu testu je uvedený v doplnku 8.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

4. Predovšetkým by mala byť známa rozpustnosť vo vode, hodnota log K_{ow}, rozdeľovacia konštanta pôdnej vody a tlak pary testovanej chemikálie. Žiaduce sú tiež doplnkové informácie o osude testovanej chemikálie v pôde, napríklad rýchlosť biotickej a abiotickej degradácie.

5. Táto testovacia metóda sa môže použiť na chemikálie rozpustné alebo nerozpustné vo vode. Spôsob aplikácie testovanej chemikálie sa však bude zodpovedajúcim spôsobom líšiť. Testovacia metóda nie je použiteľná v prípade prchavých chemikálií, t. j. chemikálií, pre ktoré je hodnota Henryho konštanty alebo rozdeľovacej konštanty vzduch/voda vyššia ako jeden, alebo chemikálií, pre ktoré tlak pár pri teplote 25 °C presahuje hodnotu 0,0133 Pa.

▼M6

PLATNOSŤ TESTU

6. Na to, aby sa výsledok testu považoval za platný, by v kontrolných vzorkách bez aplikovanej chemikálie mali byť splnené tieto kritériá:

— stredná mortalita dospelých samičiek by nemala presiahnuť 20 % na konci testu,

— stredný počet juvenilných jedincov v každom replikáte (desať dospelých samičiek) by mala byť najmenej 50 na konci testu,

— variačný koeficient vypočítaný pre počet mladých roztočov v replikáte by nemal byť vyšší ako 30 % na konci konečného testu.

REFERENČNÁ CHEMIKÁLIA

7. Musia sa stanoviť hodnoty koncentrácií EC_x a/alebo NOEC referenčnej chemikálie, aby sa zabezpečilo, že laboratórne podmienky testu sú primerané, a aby sa overilo, že reakcia testovaných organizmov sa postupom času výrazne nezmenila. Vhodnou referenčnou chemikáliou je dimetoát (CAS 60-51-5), pri ktorom sa preukázalo, že ovplyvňuje veľkosť populácie (4). Ako alternatívna referenčná chemikália sa môže použiť kyselina boritá (CAS 10043-35-3). S touto chemikáliou sa zatiaľ získalo menej skúseností. Možné sú dve alternatívne koncepcie:

— Referenčná chemikália sa môže testovať súbežne so stanovením toxicity každej testovanej chemikálie s jednou koncentráciou, ktorá sa musí vopred preukázať v štúdii odozvy na dávku s výsledkom zníženia počtu potomstva o > 50 %. V tomto prípade by mal byť počet replikátov rovnaký ako pri kontrolných vzorkách (pozri bod 29).

— Alternatívne sa referenčná chemikália testuje jeden až dvakrát ročne v rámci testu odozvy na dávku. V závislosti od zvolenej koncepcie sa líši počet koncentrácií a replikátov, ako aj faktor rozstupu (pozri bod 29), ale dosiahnuť by sa mala reakcia zodpovedajúca účinku 10 – 90 % (faktor rozstupu 1,8). Hodnota EC_{50} pre dimetoát, na základe počtu juvenilných jedincov, by mala byť v rozsahu 3,0 – 7,0 mg účinnej látky/kg pôdy (suchá hmotnosť). Podľa výsledkov získaných doteraz s kyselinou boritou by hodnota EC50 na základe počtu juvenilných jedincov mala byť v rozsahu 100 – 500 mg/kg /kg suchej hmotnosti pôdy.

OPIS TESTU

Testovacie nádoby a vybavenie

8. Používať by sa mali testovacie nádoby s priemerom 3 – 5 cm (výška pôdy ≥ 1,5 cm), vyrobené zo skla alebo iného chemicky inertného materiálu a s priliehavým vekom. Uprednostňujú sa skrutkovacie uzávery a v tom prípade by sa nádoby mohli prevzdušňovať dvakrát týždenne. Alternatívne sa môžu používať uzávery, ktoré umožňujú priamu výmenu plynov medzi substrátom a atmosférou (napr. gáza). Keďže obsah vlhkosti musí byť počas testu dostatočne vysoký, je dôležité počas testu kontrolovať hmotnosť každej testovacej nádoby a v prípade potreby doplniť vodu. Toto môže byť mimoriadne dôležité, ak nie sú k dispozícii žiadne skrutkovacie uzávery. Ak sa používa nepriesvitná testovacia nádoba, uzáver by mal byť vyrobený z materiálu, ktorý umožňuje prístup svetla (napr. perforovaný priesvitný uzáver), ale zároveň zabraňuje roztočom v úniku. Veľkosť a druh testovacej nádoby závisí od metódy extrakcie (podrobnosti sú uvedené v dodatku 5). Ak sa tepelná extrakcia deje priamo v testovacej nádobe, mohlo by sa pridať spodné sito s vhodnou veľkosťou ôk (utesnené až do extrakcie) a hĺbka pôdy by mala byť dostatočná na to, aby sa dosiahol gradient teploty a vlhkosti.

▼M6

9. Potrebné je bežné laboratórne vybavenie, konkrétne:

— prednostne sklené nádoby so skrutkovacími uzávermi,

— skrinka na sušenie,

— stereomikroskop,

— kefy na prenos roztočov,

— pH-meter a luxmeter,

— vhodné presné váhy,

— vhodné zariadenie na regulovanie teploty,

— vhodné zariadenia na regulovanie vlhkosti vzduchu (nie je to nevyhnutné, ak nádoby s exponovanými vzorkami majú veká),

— inkubátor alebo malá miestnosť s reguláciou teploty,

— zariadenie na extrakciu (pozri dodatok 5) (13),

— vrchný osvetľovací panel s reguláciou osvetlenia,

— nádoby na zbieranie vybratých roztočov.

Príprava umelej pôdy

10. Pri tomto teste sa použije umelo pripravená pôda. Umelo pripravená pôda sa skladá z týchto zložiek (všetky hodnoty sú založené na suchej hmotnosti):

— 5 % rašeliny, vysušenej vzduchom a jemne drvenej (prijateľné sú častice veľkosti 2 mm ± 1 mm);

— 20 % kaolínovej hliny (obsah kaolinitu podľa možnosti nad 30 %),

— približne 74 % vzduchom vysušeného kremenného piesku (v závislosti od potrebného množstva $CaCO_3$), prevažne jemný piesok s viac ako 50 % častíc s veľkosťou od 50 do 200 mikrónov. Presné množstvo piesku závisí od množstva $CaCO_3$ (pozri nižšie), pričom spoločne by mali predstavovať až 75 %,

— < 1 % uhličitanu vápenatého ($CaCO_3$, práškový, analytickej čistoty) na dosiahnutie hodnoty pH 6,0 ± 0,5; pridávané množstvo uhličitanu vápenatého môže do značnej miery závisieť od kvality/vlastností rašeliny (pozri poznámku 1).

Poznámka 1: potrebné množstvo $CaCO_3$ bude závisieť od zložiek pôdneho substrátu a malo by sa stanoviť na základe merania hodnoty pH čiastkových vzoriek pôdy bezprostredne pred testom (14).

Poznámka 2: obsah rašeliny v umelej pôde sa líši od iných testovacích metód s pôdnymi organizmami, kde sa vo väčšine prípadov používa 10 % rašeliny [napr. (15)]. Podľa organizácie EPPO (16) však typická poľnohospodárska pôda neobsahuje viac ako 5 % organickej hmoty, a tak zníženie obsahu rašeliny odráža zníženú možnosť sorpcie testovanej chemikálie na organický uhlík v prírodnej pôde.

Poznámka 3: ak je to potrebné, napríklad na konkrétne účely testovania, prírodná pôda z neznečistených miest môže slúžiť aj ako testovací a/alebo kultivačný substrát. Ak sa však použije prírodná pôda, mali by sa uviesť prinajmenšom údaje o pôvode (mieste odberu), pH, textúre (rozdelení veľkosti častíc) a obsahu organických látok. Zahrnutý by mal byť aj druh a názov pôdy podľa klasifikácie pôdy, ak je k dispozícii, a pôda by nemala

▼M6

byť ničím kontaminovaná. V prípade, že testovanou chemikáliou je kov alebo organokovová zlúčenina, mala by sa určiť aj kapacita katiónovej výmeny prírodnej pôdy. Osobitnú pozornosť je potrebné venovať plneniu kritérií platnosti, keďže základné informácie o prírodných pôdach sú spravidla zriedkavé.

11. Suché zložky pôdy sa dôkladne zmiešajú (napr. vo veľkokapacitnom laboratórnom miešači). Na stanovenie pH sa používa zmes pôdy a roztoku 1 M chloridu draselného (KCl) alebo 0,01 M roztoku chloridu vápenatého ($CaCl_2$) v pomere 1: 5 (pozri literatúru (14) a dodatok 3). Ak je pôda kyslejšia než požadovaný rozsah (pozri bod 10), môže sa upraviť pridaním príslušného množstva $CaCO_3$. Ak je pôda príliš alkalická, môže sa upraviť pridaním väčšieho množstva zmesi obsahujúcej prvé tri zložky uvedené v bode 10, no bez $CaCO_3$.

12. Maximálna kapacita zadržiavania vody umelej pôdy sa stanoví v súlade s postupmi opísanými v dodatku 2. Dva až sedem dní pred začiatkom testu sa suchá umelá pôda predvlhčí pridaním dostatočného množstva destilovanej alebo deionizovanej vody, aby sa dosiahla približne polovica konečného obsahu vody, čo je 40 – 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody. Obsah vlhkosti sa upraví na 40 – 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody pridaním roztoku testovanej chemikálie a/alebo pridaním destilovanej alebo deionizovanej vody (pozri body 16 až 18). Hrubú kontrolu obsahu vlhkosti v pôde je možné vykonať jemným stláčaním pôdy v ruke. Ak je obsah vlhkosti správny, medzi prstami by sa mali objaviť malé kvapky vody.

13. Obsah vlhkosti v pôde sa stanoví na začiatku a na konci testu vysušením na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C v súlade s normou ISO 11465 (17) a hodnota pH pôdy sa stanoví v súlade s dodatkom 3 alebo normou ISO 10390 (14). Tieto merania by sa mali vykonať v doplnkových vzorkách bez roztočov, z kontrolnej vzorky pôdy aj zo vzorky pôdy s každou testovacou koncentráciou. Hodnota pH pôdy by sa pri testovaní kyslých alebo zásaditých chemikálií nemala upravovať. Obsah vlhkosti by sa mal monitorovať počas celého testu pravidelným vážením nádob (pozri body 20 a 24).

Výber a príprava testovaných živočíchov

14. V rámci testu sa používa druh *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). Na začiatku testu sú potrebné dospelé samičky roztočov, získané zo synchronizovanej populácie. Roztoče by sa mali vložiť do nádob približne 7 – 14 dní pred dosiahnutím dospelosti, 28 – 35 dní po začiatku kladenia vajíčok v rámci synchronizácie (pozri bod 3 a dodatok 4). Zdroj roztočov alebo dodávateľ a udržiavateľ laboratórnej kultúry by sa mali zaznamenať. Ak sa laboratórna kultúra uchováva, odporúča sa potvrdiť identitu daného druhu najmenej raz do roka. Identifikačný list je uvedený v dodatku 6.

Príprava testovaných koncentrácií

15. Testovaná chemikália sa zamieša do pôdy. Organické rozpúšťadlá používané na pomoc pri aplikovaní testovanej chemikálie do pôdy by sa mali vyberať na základe ich nízkej toxicity pre roztoče a do koncepcie testu musí byť zahrnutá primeraná kontrola rozpúšťadla (pozri bod 29).

Testovaná chemikália rozpustná vo vode

16. Roztok testovanej chemikálie sa pripravuje s deionizovanou vodou v množstve dostatočnom pre všetky replikáty jednej testovacej koncentrácie. Odporúča sa použitie primeraného množstva vody, aby sa dosiahol požadovaný obsah vlhkosti, t. j. 40 – 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody (pozri bod 12). Každý roztok testovanej chemikálie sa pred vložením do testovacej nádoby dôkladne premieša s jednou šaržou predvlhčenej pôdy.

▼M6

Testovaná chemikália nerozpustná vo vode

17. V prípade chemikálií nerozpustných vo vode, ale rozpustných v organických rozpúšťadlách, sa testovaná chemikália môže rozpustiť v čo najmenšom objeme vhodného nosiča (napr. acetónu). Používať by sa mali iba prchavé rozpúšťadlá. Keď sa použijú takéto nosiče, všetky testovacie koncentrácie a kontrolné vzorky by mali obsahovať rovnaké minimálne množstvo nosiča. Nosič sa nastrieka na malé množstvo, napríklad 10 g, jemného kremenného piesku, alebo sa s ním zmieša. Celkový obsah piesku v substráte by sa mal upraviť na toto množstvo. Nosič sa odstráni najmenej hodinovým odparovaním pod digestorom. Táto zmes kremenného piesku a testovanej chemikálie sa pridá do predvlhčenej pôdy a po pridaní primeraného množstva deionizovanej vody, aby sa dosiahol požadovaný obsah vlhkosti, sa dôkladne premieša. Konečná zmes sa vloží do testovacích nádob. Treba si uvedomiť, že niektoré rozpúšťadlá môžu byť pre roztoče toxické. Preto sa odporúča použiť doplnkové kontrolné vzorky vody bez nosiča, ak toxicita rozpúšťadla pre roztoče nie je známa. Ak sa náležite preukáže, že rozpúšťadlo (v koncentráciách, ktoré sa majú použiť) nemá žiadne účinky, kontrolné vzorky vody sa môžu vylúčiť.

Testovaná chemikália slabo rozpustná vo vode a v organických rozpúšťadlách

18. V prípade chemikálií, ktoré sú slabo rozpustné vo vode a v organických rozpúšťadlách, sa ekvivalent 2,5 g jemne drveného kremenného piesku na jednu testovaciu nádobu (napr. 10 g jemného kremenného piesku na štyri replikáty) zmieša s príslušným množstvom testovanej chemikálie na dosiahnutie požadovanej testovacej koncentrácie. Celkový obsah piesku v substráte by sa mal upraviť na toto množstvo. Táto zmes kremenného piesku a testovanej chemikálie sa pridá do predvlhčenej pôdy a po pridaní primeraného množstva deionizovanej vody, aby sa dosiahol požadovaný obsah vlhkosti, sa dôkladne premieša. Konečná zmes sa rozdelí do testovacích nádob. Tento postup sa opakuje pre každú testovaciu koncentráciu a pripraví sa vhodná kontrolná vzorka.

POSTUP

Testované skupiny a kontrolné vzorky

19. Odporúča sa vložiť do každej nádoby s kontrolnou vzorkou a nádoby s aplikovanou chemikáliou desať dospelých samičiek v 20 g suchej hmotnosti umelej pôdy. Testované organizmy by sa mali pridať do dvoch hodín po príprave konečného testovacieho substrátu (t. j. po aplikácii testovanej chemikálie). V osobitných prípadoch (napr. ak sa starnutie považuje za rozhodujúci faktor) je možné predĺžiť čas medzi prípravou záverečného testovacieho substrátu a vložením roztočov [podrobnosti týkajúce sa takého starnutia sú uvedené v literatúre pod číslom (18)]. V takýchto prípadoch sa však musí poskytnúť vedecké zdôvodnenie.

20. Po vložení do pôdy sa roztočom poskytne potrava a mala by sa odmerať počiatočná hmotnosť každej testovacej nádoby. Tento údaj sa použije ako referenčná hodnota pre monitorovanie obsahu vlhkosti v pôde počas testu, ako je uvedené v bode 24. Testovacie nádoby sa potom uzavrú, ako je opísané v bode 8, a uložia do testovacej komory.

21. Pre každú z metód aplikácie testovanej chemikálie opísaných v bodoch 15 – 18 sa pripraví vhodná kontrolná vzorka. Pri príprave kontrolných vzoriek sa dodržiavajú príslušné uvedené postupy, s výnimkou toho, že sa nepridá testovaná chemikália. Preto, ak je to vhodné, do kontrolných vzoriek sa pridávajú organické rozpúšťadlá, kremenný piesok alebo iné nosiče v rovnakých koncentráciách/množstvách ako do vzoriek s aplikovanou chemikáliou. Ak sa na pridávanie testovanej chemikálie používa rozpúšťadlo alebo iný nosič, mali by sa pripraviť a otestovať aj doplnkové kontrolné vzorky bez nosiča alebo testovanej chemikálie, ak toxicita rozpúšťadla nie je známa (pozri bod 17).

▼M6

Podmienky testu

22. Testovacia teplota by mala byť 20 °C ± 2 °C. Teplota by sa mala zaznamenať minimálne jedenkrát za deň a v prípade potreby upraviť. Test sa vykonáva v kontrolovaných cykloch svetla a tmy (podľa možnosti 16 hodín svetla a 8 hodín tmy) s intenzitou osvetlenia 400 – 800 luxov v okolí testovacích nádob. Z dôvodu porovnateľnosti sú tieto podmienky rovnaké ako pri iných pôdnych ekotoxikologických testoch [napr. (15)].

23. V prípade použitia skrutkovacích uzáverov by sa mala zabezpečiť výmena plynov prevzdušňovaním testovacích nádob najmenej dvakrát týždenne. Ak sa použijú gázové veká, osobitnú pozornosť treba venovať udržiavaniu obsahu vlhkosti v pôde (pozri body 8 a 24).

24. Obsah vody v pôdnom substráte v testovacích nádobách sa počas celého testu udržiava pravidelným vážením testovacích nádob a v prípade potreby doplňaním vody (napr. raz týždenne). Straty sa podľa potreby dopĺňajú deionizovanou vodou. Obsah vlhkosti by sa počas testu nemal líšiť od počiatočnej hodnoty o viac ako 10 %.

Kŕmenie

25. Ako vhodný zdroj potravy sa ukázali syrové roztoče [*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)]. Vhodné môžu byť aj malé chvostoskoky (napr. mladé jedince druhu *Folsomia candida* Willem, 1902 alebo *Onychiurus fimatus*) (19), (20), červy čeľade *Enchytraeidae* (napr. *Enchytraeus crypticus* Westheide a Graefe, 1992) alebo hlístovce (napr. *Turbatrix silusiae* de Man, 1913) (21). Odporúča sa kontrolovať potravu pred použitím v rámci testu. Druhom a množstvom potravy by sa mal zabezpečiť dostatočný počet juvenilných jedincov v záujme splnenia kritérií platnosti (bod 6). Pri výbere koristi by sa mal zvážiť spôsob pôsobenia testovanej chemikálie (napr. akaricídny prostriedok môže byť toxický aj pre potravinové roztoče, pozri bod 26).

26. Potrava by sa mala poskytovať *ad libitum* [t. j. zakaždým v malom množstve (na špičku lopatky)]. Na tento účel sa môže tiež použiť odsávač s miernym saním, ako sa navrhuje v teste s chvostoskokmi, alebo jemný štetec. Dodanie potravy na začiatku testu a potom dva- až trikrát týždenne obvykle postačuje. Ak sa testovaná chemikália zdá byť toxická pre korisť, je potrebné zvážiť zintenzívnenie kŕmenia a/alebo alternatívny zdroj potravy.

Výber testovaných koncentrácií

27. Predchádzajúce poznatky o toxicite testovanej chemikálie by mali pomôcť pri výbere vhodných testovaných koncentrácií, napríklad zo štúdií týkajúcich sa vyhľadávania rozsahu. V prípade potreby sa vykoná test na vyhľadávanie rozsahu s piatimi koncentráciami testovanej chemikálie v rozsahu 0,1 – 1 000 mg/kg suchej pôdy, najmenej s jedným replikátom pre každú vzorku s aplikovanou chemikáliou a kontrolnú vzorku. Test na vyhľadávanie rozsahu trvá 14 dní a na konci testu sa posudzuje mortalita dospelých roztočov a počet juvenilných jedincov. Rozsah koncentrácií v konečnom teste by sa mal podľa možnosti zvoliť tak, aby zahŕňal koncentrácie, ktoré ovplyvňujú počty juvenilných jedincov, ale neovplyvňujú prežívanie materskej generácie. To však nemusí byť možné pre chemikálie, ktoré spôsobujú letálne a subletálne účinky pri takmer rovnakých koncentráciách. Účinná koncentrácia (napr. EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) a rozsah koncentrácií, v ktorom sa skúmajú účinky testovanej chemikálie, by mali byť v rozsahu koncentrácií použitých v rámci testu. Iba vo výnimočných prípadoch by sa mala robiť extrapolácia hlboko pod najnižšou koncentráciou, ktorá ovplyvňuje testovaný organizmus, alebo nad najvyššou testovacou koncentráciou. V takých prípadoch by sa malo v protokole uviesť úplné vysvetlenie.

Koncepcia experimentu

Testy závislosti reakcie od dávky

28. Na základe odporúčaní vyplývajúcich z ďalšej medzilaboratórnej porovnávacej skúšky sa navrhujú tri koncepcie testu [skúška reprodukcie bielych

▼M6

červov (*Enchytraeid*) (22)]. Všeobecnú vhodnosť všetkých týchto koncepcií potvrdil výsledok validácie druhu *H. aculeifer*.

29. Pri stanovení rozsahu koncentrácií treba mať na zreteli tieto skutočnosti:

— na stanovenie hodnoty EC_x (napr. EC_{10}, EC_{50}) by sa malo testovať dvanásť koncentrácií. Odporúčajú sa najmenej dva replikáty pre každú testovanú koncentráciu a šesť kontrolných replikátov. Faktor rozstupu sa môže meniť, t. j. môže mať hodnotu najviac 1,8 v očakávanom rozsahu účinkov a viac ako 1,8 pri vyšších a nižších koncentráciách.

— Na stanovenie hodnoty NOEC by sa malo testovať aspoň päť koncentrácií v geometrickej sérii. Odporúčajú sa štyri replikáty na každú testovanú koncentráciu a osem kontrolných vzoriek. Faktor rozstupu medzi hodnotami koncentrácie by nemal presahovať 2,0.

— Kombinovaný prístup umožňuje určenie obidvoch koncentrácií, NOEC aj EC_x. Použiť by sa malo osem koncentrácií aplikovanej chemikálie v geometrickom rade. Odporúčajú sa štyri replikáty pre každú aplikáciu chemikálie a osem kontrolných vzoriek. Faktor rozstupu medzi hodnotami koncentrácie by nemal presahovať 1,8.

Limitný test

30. Ak sa v rámci testu na vyhľadávanie rozsahu nepozorujú žiadne účinky ani pri najvyššej koncentrácii (t. j. 1 000 mg/kg suchej hmotnosti pôdy), konečný reprodukčný test sa môže vykonať ako limitný test s použitím testovacej koncentrácie 1 000 mg/kg suchej hmotnosti pôdy. Limitný test umožní dokázať, že hodnota NOEC alebo EC_{10} z hľadiska reprodukcie je vyššia ako limitná koncentrácia, a zároveň sa minimalizuje počet roztočov použitých v rámci testu. Pre vzorky pôdy s aplikovanou chemikáliou aj pre kontrolné vzorky by sa malo použiť osem replikátov.

Trvanie testu a merania

31. Mali by sa zaznamenať všetky zistené rozdiely medzi správaním a morfológiou roztočov v kontrolných nádobách a v nádobách s aplikovanou chemikáliou.

32. Na 14. deň sa roztoče, ktoré prežili, vyberú z pôdy extrakciou pomocou tepla/svetla alebo inou vhodnou metódou (pozri dodatok 5). Osobitne sa spočítajú juvenilné jedince (t. j. larvy, protonymfy a deutonymfy) a dospelé jedince. Všetky dospelé roztoče, ktoré sa v tomto čase nenájdu, sa zaznamenajú ako mŕtve, lebo je možné predpokladať, že takéto roztoče pred hodnotením uhynuli a rozložili sa. Účinnosť extrakcie sa musí overovať raz alebo dvakrát ročne v kontrolných vzorkách so známym počtom dospelých a juvenilných jedincov. Účinnosť by mala v priemere presahovať hodnotu 90 %, kombinovane pre všetky vývojové štádiá (pozri dodatok 5). Počty dospelých a juvenilných jedincov sa neupravujú z hľadiska účinnosti.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

33. Informácie o štatistických metódach, ktoré sa môžu použiť na analýzu výsledkov testu, sú uvedené v bodoch 36 až 41. Okrem toho je potrebné používať dokument OECD 54 „Súčasné prístupy k štatistickej analýze údajov o ekotoxicite: návod na uplatňovanie“ (31).

34. Hlavným parametrom testu je reprodukčný výstup, v tomto prípade počet juvenilných jedincov vyprodukovaných na jednu paralelnú testovaciu nádobu (s desiatimi vloženými dospelými samičkami). Štatistická analýza si vyžaduje aritmetický priemer (x) a rozptyl (s^2) reprodukčného výstupu, ktorý sa vypočíta

▼M6

na jednu vzorku s aplikovanou chemikáliou a na jednu kontrolnú vzorku. Hodnoty x a s^2 sa používajú v rámci postupov ANOVA, ako je napríklad Studentov t-test, Dunnettov test alebo Williamsov test, ako aj na výpočet 95 % intervalov spoľahlivosti.

Poznámka: Tento hlavný parameter je rovnocenný s parametrom plodnosti, ktorá sa určuje ako podiel počtu žijúcich juvenilných jedincov vyprodukovaných počas testu a počtu rodičovských samičiek použitých na začiatku testu.

35. Počet samičiek, ktoré prežili v kontrolných vzorkách bez aplikovanej chemikálie, je hlavným kritériom platnosti a musí sa zdokumentovať. Podobne ako v rámci testu na vyhľadávanie rozsahu by sa aj všetky škodlivé príznaky mali uviesť v záverečnej správe.

ECx

36. Hodnoty ECx vrátane ich príslušných spodných a vrchných 95 % hraníc spoľahlivosti pre parameter uvedený v bode 34 sa vypočítajú pomocou vhodných štatistických metód (napr. probitová analýza, logistická alebo Weibullova funkcia, upravená Spearman-Karberova metóda alebo jednoduchá interpolácia). Koncentrácia EC_x sa získa zadaním hodnoty, ktorá zodpovedá x % strednej hodnoty nameranej v kontrolnej vzorke, do príslušnej rovnice. Pri výpočte EC_{50} alebo akejkoľvek inej hodnoty EC_x by sa mali stredné hodnoty pre každú vzorku s aplikovanou chemikáliou (x) podrobiť regresnej analýze.

NOEC/LOEC

37. Ak je cieľom štatistickej analýzy stanovenie koncentrácie NOEC/LOEC, potrebné sú štatistické údaje pre každú nádobu (jednotlivé nádoby sa považujú za replikáty). Používať by sa mali vhodné štatistické metódy (podľa dokumentu OECD 54 „Súčasné prístupy k štatistickej analýze údajov o ekotoxicite: návod na uplatňovanie“). Vo všeobecnosti sa nepriaznivé účinky testovanej chemikálie v porovnaní s kontrolnými vzorkami skúmajú pomocou jednostranného (obmedzeného) testovania hypotéz pri hodnote $p \leq 0,05$. Príklady sú uvedené v ďalších bodoch.

38. Normálne rozloženie údajov sa môže testovať napríklad Kolmogorovovým-Smirnovovým testom dobrej zhody, testom pomeru rozsahu k štandardnej odchýlke (R/s test) alebo Shapiro-Wilkovým testom (dvojstranný, $p \leq 0,05$). Na testovanie homogenity variancie sa môže použiť Cochranov test, Levenov test alebo Barlettov test (dvojstranný, $p \leq 0,05$). Ak sú splnené požiadavky postupov parametrických testov (normalita, homogenita variancie), môže sa vykonať jednostranná analýza variancie (ANOVA) a následné testy viacnásobného porovnania. Viacnásobné porovnania (napr. Dunnettov t-test) alebo testy zmiernenia trendu (napr. Williamsov test v prípade monotónneho vzťahu dávky a reakcie) sa môžu použiť na výpočet, či existujú výrazné rozdiely ($p \leq 0,05$) medzi kontrolnými vzorkami a vzorkami s rôznymi koncentráciami testovanej chemikálie (výber odporúčaných testov podľa dokumentu OECD 54 „Súčasné prístupy k štatistickej analýze údajov o ekotoxicite: návod na uplatňovanie“). Inak by sa na stanovenie koncentrácií NOEC a LOEC mali použiť neparametrické metódy (napr. Bonferroniho U-test podľa Holma alebo Jonckheereho-Terpstrov test trendu).

Limitný test

39. Ak sa vykonal limitný test (porovnanie kontrolnej vzorky a len jednej vzorky s aplikovanou chemikáliou) a ak sú splnené požiadavky postupov parametrických testov (normalita, homogenita), metrické reakcie je možné hodnotiť pomocou Studentovho testu (t-test). Ak tieto požiadavky nie sú splnené, je možné použiť t-test nerovnakej variancie (Welchov t-test) alebo neparametrický test, ako napríklad Mannov-Whitneyho U-test.

40. S cieľom určiť významné rozdiely medzi kontrolnými vzorkami (kontrolné vzorky a kontrolné vzorky s rozpúšťadlom) sa môžu replikáty každej kontrolnej vzorky testovať tak, ako je uvedené pre limitný test. V prípade,

▼M6

že sa týmito testami nezistia významné rozdiely, všetky replikáty kontrolných vzoriek a kontrolných vzoriek s rozpúšťadlom sa môžu spojiť. Inak by sa mali všetky vzorky s aplikovanou chemikáliou porovnať s kontrolnými vzorkami s rozpúšťadlom.

Protokol o skúške

41. Protokol o skúške by mal obsahovať prinajmenšom tieto informácie:

— *Testovaná chemikália*

— identita testovanej chemikálie, názov, číslo šarže, číslo dávky a číslo CAS, čistota,

— fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie (napr. log K_{ow}, rozpustnosť vo vode, tlak pary, Henryho konštanta (H), a pokiaľ možno, informácie o osude testovanej chemikálie v pôde).

— *Testované organizmy*

— identifikácia a dodávateľ testovaných organizmov, opis podmienok kultivácie,

— vekový rozsah testovaných organizmov.

— *Podmienky testu*

— opis koncepcie experimentu a postupu,

— podrobnosti o príprave testovacej pôdy, podrobnosti o príprave testovacej pôdy; podrobné špecifikácie, ak sa použila prírodná pôda (pôvod, história, rozdelenie veľkosti častíc, pH, obsah organickej hmoty a klasifikácia pôdy, ak je k dispozícii),

— maximálna kapacita zadržiavania vody v pôde,

— opis metódy, ktorá sa použila na aplikáciu testovanej chemikálie do pôdy,

— údaje o pomocných chemikáliách použitých na podávanie testovanej chemikálie,

— veľkosť testovacích nádob a suchá hmotnosť testovacej pôdy na jednu nádobu,

— podmienky testu: intenzita svetla, trvanie cyklov svetla a tmy, teplota,

— opis kŕmneho režimu, druh a množstvo potravy, ktorá sa používala v rámci testu, dátumy kŕmenia,

— hodnoty pH a obsah vody v pôde na začiatku a počas testu (kontrolné vzorky a každá vzorka s aplikovanou chemikáliou),

— podrobný opis metódy extrakcie a účinnosti extrakcie.

— *Výsledky testu*

— počet juvenilných jedincov stanovený v každej testovacej nádobe na konci testu,

— počet dospelých samičiek a mortalita dospelých jedincov (%) v každej testovacej nádobe na konci testu,

— opis zjavných príznakov alebo výrazných zmien v správaní,

— výsledky získané s referenčnými vzorkami testovanej chemikálie,

— súhrnné štatistické údaje (EC_x a/alebo NOEC) vrátane 95 % hranice spoľahlivosti a opis metódy výpočtu,

▼**M6**

— krivka závislosti veličiny od koncentrácie.

— Uvedú sa odchýlky od postupov opísaných v tejto testovacej metóde a všetky nezvyčajné udalosti počas testu.

LITERATÚRA

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. Chapter C.8 of this Annex -. Toxicity for Earthworms..

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. Chapter C.32 of this Annex- Enchytraeid reproduction test.

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 (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006)18

▼M6

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov

Na účely tejto testovacej metódy sa používajú tieto vymedzenia pojmov (v rámci tohto testu sa všetky účinné koncentrácie vyjadrujú ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovacej pôdy):

Chemikália je látka alebo zmes.

NOEC (koncentrácia bez pozorovaného účinku) je koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej sa nepozoruje žiadny účinok. V tomto teste koncentrácia zodpovedajúca hodnote NOEC nemá žiadny štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) v rámci daného expozičného času v porovnaní s kontrolnou vzorkou.

LOEC (najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom) je najnižšia koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá má štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) v rámci daného času expozície v porovnaní s kontrolnou vzorkou.

EC_x (účinná koncentrácia x %) je koncentrácia, ktorá v rámci stanoveného času expozície vyvolá účinok x % na testované organizmy v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Napríklad EC_{50} je koncentrácia, pri ktorej sa odhaduje, že v stanovenom čase expozície vyvolá účinok na výsledok testu pri 50 % exponovanej populácie.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

▼**M6**

Dodatok 2

Stanovenie maximálnej kapacity zadržiavania vody v pôde

Táto metóda stanovenia maximálnej kapacity zadržiavania vody v pôde sa považuje za vhodnú. Opísaná je v prílohe C normy ISO DIS 11268-2 [Kvalita pôdy – účinky znečisťujúcich látok na dážďovky (*Eisenia fetida*), časť 2: Part 2: Stanovenie účinkov na reprodukciu (23)].

Pomocou vhodného zariadenia na odber vzoriek (špirálová trubica atď.) sa odoberie určené množstvo (napr. 5 g) testovacieho pôdneho substrátu. Spodná časť trubice sa zakryje kúskom filtračného papiera a po naplnení vodou sa umiestni na stojan vo vodnom kúpeli. Trubica by sa mala postupne ponárať do vody, až kým vodná hladina nestúpne nad vrchnú vrstvu pôdy. Potom by sa mala nechať vo vode približne tri hodiny. Keďže nie všetka voda, ktorú absorbujú kapiláry pôdy, sa môže zachovať, vzorke pôdy by sa malo umožniť odvodnenie počas dvoch hodín tak, že sa trubica uloží na vrstvu veľmi mokrého jemne drveného kremenného piesku v uzavretej nádobe (aby sa zabránilo vysúšaniu). Vzorka by sa potom mala odvážiť a vysušiť na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C. Kapacitu zadržiavania vody (WHC) je možné vypočítať takto:

$$\mathrm{WHC}(\text{v\% suchej hmotnosti}) = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

kde:

S = vodou saturovaný substrát + hmotnosť trubice + hmotnosť filtračného papiera,

T = hmotnosť obalu (hmotnosť trubice + hmotnosť filtračného papiera),

D = suchá hmotnosť substrátu.

▼**M6**

Dodatok 3

Stanovenie pH pôdy

Táto metóda stanovenia pH pôdy je založená na opise uvedenom v norme ISO DIS 10390: Kvalita pôdy – stanovenie pH (16).

Určené množstvo pôdy sa suší pri teplote miestnosti najmenej 12 hodín. Potom sa vytvorí suspenzia pôdy (obsahujúca najmenej 5 g pôdy) s päťnásobným objemom 1 M roztoku chloridu draselného (KCl) analytickej čistoty alebo 0,01 M roztoku chloridu vápenatého ($CaCl_2$) analytickej čistoty. Suspenzia sa následne päť minút dôkladne pretrepáva a potom sa nechá stáť najmenej 2 hodiny, ale nie dlhšie ako 24 hodín. Hodnota pH kvapalnej fázy sa potom meria pH metrom, ktorý sa pred každým meraním kalibruje pomocou vhodnej série tlmivých roztokov (napr. s pH 4,0 a 7,0).

▼M6

Dodatok 4

Chov druhu *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*, potravinové roztoče a synchronizácia kultúry

Chov druhu *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*:

Kultúry sa môžu uchovávať v plastových nádobách alebo sklených pohároch naplnených zmesou sadry a prášku z dreveného uhlia (9: 1). Sadra sa môže udržiavať vo vlhkom stave pridaním niekoľkých kvapiek destilovanej alebo deionizovanej vody, ak je to potrebné. Optimálna teplota na chov je 20 °C ± 2 °C, režim svetla a tmy nie je pre tento druh dôležitý. Korisťou môžu byť roztoče druhu *Typrophagus putrescentiae* alebo *Caloglyphus* sp. (s potravinovými roztočmi by sa malo zaobchádzať opatrne, lebo môžu spôsobovať alergie u ľudí), ale ako korisť sú vhodné aj háďatká, červy čeľade *Enchytraeidae* a chvostoskoky. Ich zdroje by sa mali zaznamenať. Vývoj populácie sa môže začať s jednou samičkou, lebo samčekovia sa vyvíjajú v neoplodnených vajíčkach. Generácie sa do značnej miery prekrývajú. Samička môže žiť najmenej 100 dní a môže počas svojho života naklásť približne 100 vajíčok. Najvyššiu mieru kladenia vajíčok dosahujú samičky v období 10 – 40 dní (odkedy dospejú) a dosahuje hodnotu až 2,2 vajíčka na samičku^{-1} a deň$^{-1}$. Čas vývoja od vajíčka po dospelú samičku je približne 20 dní pri teplote 20 °C. Pred začiatkom tohto vývoja by sa malo založiť a udržiavať viac kultúr.

Chov druhu *Typrophagus putrescentiae*:

Roztoče sa uchovávajú v sklenej nádobe naplnenej jemným práškovým pivovarníckym droždím, ktorá sa vloží do plastového vedra naplneného roztokom KNO_3 s cieľom zabrániť úniku. Potravinové roztoče sa umiestnia na vrch tohto prášku. Potom sa pomocou lopatky opatrne zmiešajú s práškom (ktorý sa má vymeniť dvakrát týždenne).

Synchronizácia kultúry:

Exempláre, ktoré sa používajú v rámci testu, by mali približne rovnako staré (asi sedem dní po dosiahnutí štádia dospelosti). Pri teplote chovu 20 °C sa to dosiahne týmto postupom:

Samičky sa presunú do čistej chovnej nádoby a poskytne sa im dostatočné množstvo potravy.

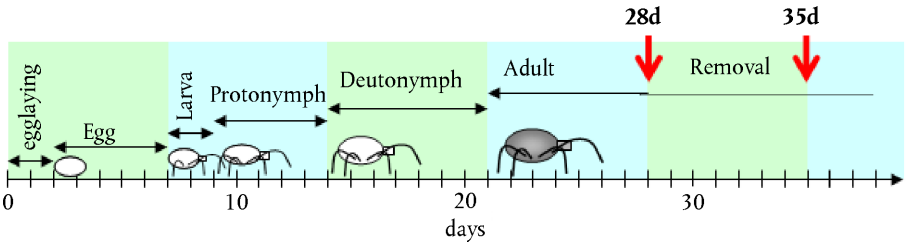
— Poskytnú sa im dva až tri dni na kladenie vajíčok, potom sa samičky premiestnia.

— Dospelé samičky sa použijú na testovanie medzi 28. a 35. dňom od začiatku ich umiestňovania do čistých chovných nádob.

Dospelé samičky je možné ľahko odlíšiť od samčekov aj od ostatných vývojových štádií podľa ich väčších rozmerov, oblejšieho tvaru a hnedého chrbtového štítu (samčekovia sú štíhlejší a plochí, nedospelé jedince sú bielej až krémovej farby). Vývoj roztočov prebieha pri teplote 20 °C približne podľa uvedenej schémy (obrázok): vajíčko päť dní, larva dva dni, protonymfa päť dní, deutonymfa sedem dní, obdobie samičky pred kladením vajíčok dva dni. Potom sú roztoče dospelé.

Obrázok

vývoj roztočov druhu *Hypoaspis aculeifer (Geolaelaps)* pri teplote 20 °C. [premiestnenie = samičky sa použijú na test]



▼**M6**

Dospelé testované živočíchy sa premiestnia zo synchronizovanej kultúry do testovacích nádob medzi 28. a 35. dňom od okamihu, keď rodičovské samičky začali klásť vajíčka (t. j. 7 – 14 dní po dosiahnutí štádia dospelosti). Tým sa zabezpečí, že testované živočíchy už prešli obdobím pred kladením vajíčok a spárili sa so samčekmi, ktoré sú takisto prítomné v kultivačnej nádobe. Pozorovania laboratórnych kultúr naznačujú, že samičky sa pária ihneď alebo krátko po dosiahnutí štádia dospelosti, ak sú prítomní samčekovia (Ruf, Vaninnen, osobné pozorovania). Obdobie siedmich dní bolo stanovené s cieľom uľahčiť zapojenie do laboratórnej rutiny a utlmiť individuálne vývojové rozdiely medzi roztočmi. Kladenie vajíčok by sa malo začať prinajmenšom s rovnakým počtom samičiek, aký je prípadne potrebný na test (ak je na test potrebných napr. 400 samičiek, najmenej 400 samičkám by sa malo umožniť klásť vajíčka dva až tri dni). Počiatočnou hranicou pre synchronizovanú populáciu by malo byť najmenej 1 200 vajíčok (pomer pohlaví približne 0,5, mortalita približne 0,2). Na prevenciu kanibalizmu je prijateľnejšie ponechať v jednej nádobe najviac 20 – 30 samičiek kladúcich vajíčka.

▼**M6**

Dodatok 5

Metódy extrakcie

V prípade mikroskopických článkonožcov je vhodnou metódou na oddelenie exemplárov od pôdy/substrátu tepelná extrakcia (pozri obrázok). Táto metóda je založená na aktivite organizmov, takže len mobilné exempláre budú mať šancu byť zaznamenané. Princípom tepelnej extrakcie je vytvoriť pre organizmy postupne sa zhoršujúce podmienky vo vzorke, takže opustia substrát a spadnú do fixačnej kvapaliny (napr. etanolu). Kľúčovými bodmi sú trvanie extrakcie a gradient prechodu od dobrých cez stredné až po zlé podmienky pre organizmy. Trvanie extrakcie na ekotoxikologické testy musí byť čo najkratšie, lebo akýkoľvek rast populácie počas extrakcie by skreslil výsledky. Na druhej strane podmienky teploty a vlhkosti vo vzorke musia byť vždy v rozsahu, ktorý umožňuje roztočom pohybovať sa. Zahrievanie vzorky pôdy vedie k vysychaniu substrátu. Ak je vysychanie príliš rýchle, niektoré roztoče môžu tiež vyschnúť skôr, ako sa im podarí uniknúť.

Preto sa navrhuje tento postup (24), (25):

Zariadenie: Tullgrenov lievik alebo porovnateľné metódy, ako napríklad McFadyenova (zahrievanie zhora, vzorka sa dáva nad lievik).

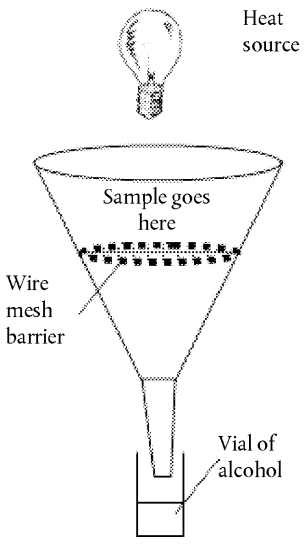
Režim zahrievania: 25 °C počas 12 hodín, 35 °C počas 12 hodín, 45 °C počas 24 hodín (spolu 48 hodín). Teplota by sa mala merať v substráte.

Fixačná kvapalina: 70 % etanol.

Postup: Zoberie sa sklená nádobka, ktorá sa používala v rámci testu. Odoberie sa uzáver a okolo otvoru sa omotá kus sieťky alebo tkaniny. Tkanina by mala mať veľkosť ôk 1,0 – 1,5 mm. Tkanina sa upevní elastickou páskou. Nádobka sa opatrne otočí hore dnom a vloží do extrakčného zariadenia. Tkanina bráni substrátu, aby vytiekol do fixačnej kvapaliny, ale umožňuje roztočom opustiť vzorku. Po vložení všetkých nádobiek sa začne režim zahrievania. Extrakcia sa skončí po 48 hodinách. Fixačné nádobky sa vyberú zo zariadenia a roztoče sa spočítajú pomocou preparačného mikroskopu.

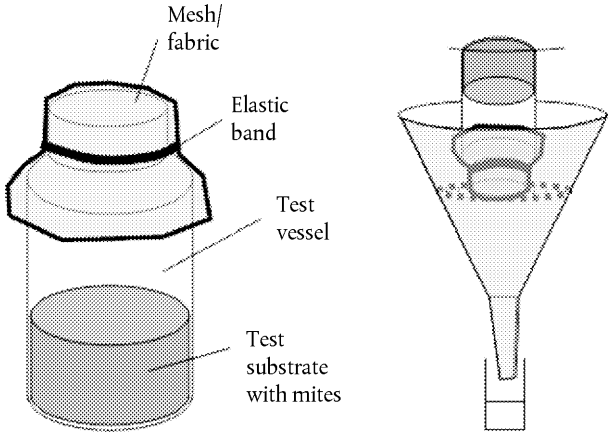
Účinnosť zvolenej metódy extrakcie sa musí overovať raz alebo dvakrát ročne s použitím nádob obsahujúcich známy počet juvenilných a dospelých roztočov v testovacom substráte bez aplikovanej chemikálie. Účinnosť extrakcie by mala byť v priemere ≥ 90 % kombinovane pre všetky vývojové štádiá.

Tullgrenovo extrakčné zariadenie



▼**M6**

Ako sa pripraví testovacia nádobka po skončení testu, pred extrakciou.



▼**M6**

Dodatok 6

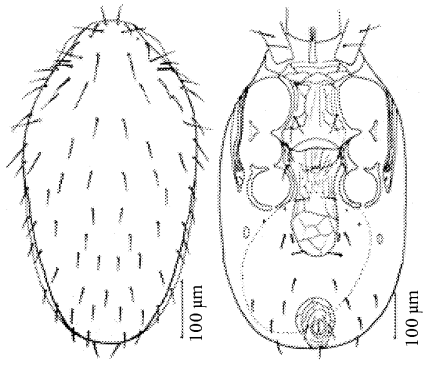
Identifikácia druhu *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Podtrieda/rad/podrad:	Čeľaď:	Rod/podrod/druh:
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

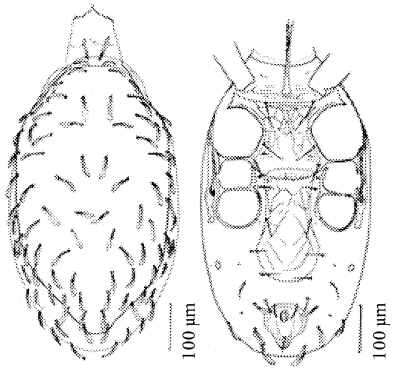
Autor a dárum:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23. január 2007

Použitá literatúra:	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, Technical Bulletin 9: 400pp. Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 pp.

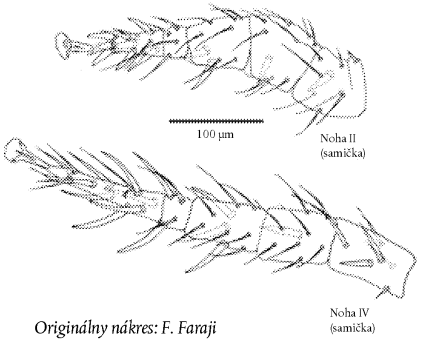
Deterministické vlastnosti:	tektum so zaobleným zúbkovaným okrajom, ryhovaný hypostom s viac ako 6 zúbkami, nie veľmi dlhé zadné chrbtové štetiny Z4, chrbtové štetiny, nie veľmi zväčšený normálny genitálny štít, ktorý nesiaha po análny štít, zadná polovica chrbtového štítu bez nespárovaných štetín, nohy II a IV s hrubými makroskopickými štetinami, chrbtové štetiny Z5 približne dvakrát dlhšie než J5, pevné články klepietok s 12 – 14 zubami a pohyblivé články s 2 zubami, zadná časť tela dlhá 520 – 685 µm. Druh *Hypoaspis miles* sa tiež používa v oblasti biologickej kontroly a mohlo by dôjsť k jeho zámene s druhom *H. aculeifer*. Hlavný rozdiel: *H. miles* patrí k podrodu *Cosmolaelaps* a má nožovité chrbtové štetiny, zatiaľ čo *H. aculeifer* patrí k podrodu *Geolaelaps* a má chĺpkovité chrbtové štetiny.



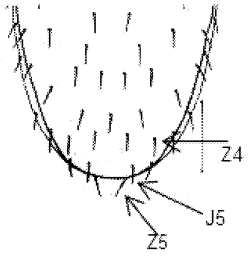
Hypoaspis aculeifer podľa: Hughes, 1976



Hypoaspis miles podľa: Hughes, 1976



Originálny nákres: F. Faraji



Hypoaspis aculeifer,
chrbtový štít s charakteristickými štetinami

▼M6

Dodatok 7

Základné informácie o biológii druhu *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Druh *Hypoaspis aculeifer* patrí do čeľade *Lealapidae*, podtriedy *Acari* (roztoče), triedy *Arachnida*, kmeňa *Arthropoda*. Roztoče žijú vo všetkých druhoch pôdy a živia sa inými roztočmi, háďatkami a chvostoskokmi (26). V prípade nedostatku potravy prejdú na kanibalizmus (27). Telo predátorských roztočov sa delí na dve časti, idiosoma (zadná časť tela) a gnathosoma (predná časť tela). Jasné rozdelenie idiosomy na prosoma (hlavohruď) a opisthosoma (brucho) chýba. Gnathosoma obsahuje nástroje na kŕmenie, ako napríklad tykadlá (palps) a klepietka (chelicery). Klepietka sa delia na tri časti a sú vybavené ostňami rôznych tvarov. Samčekovia využívajú klepietka okrem požívania potravy najmä na prenos svojich spermatických váčkov na samičky. Chrbtový štít pokrýva takmer úplne idiosoma. Veľkú časť idiosoma pri samičkách zaberajú rozmnožovacie orgány, ktoré sú obzvlášť zreteľné krátko pred ukladaním vajíčka. V brušnej časti sa nachádzajú dva štíty, hrudný a genitálny. Všetky nohy sú vybavené štetinami a ostňami. Štetiny sa používajú na uchytenie pri pohybe v pôde alebo na nej. Prvý pár nôh sa používa predovšetkým ako anténa. Druhý pár nôh sa používa nielen na pohyb, ale aj na zovretie koristi. Ostne na štvrtom páre nôh môžu slúžiť na obranu, a tiež ako pohon (28). Samčekovia sú dlhí 0,55 – 0,65 mm a majú hmotnosť 10 – 15 µg. Samičky sú dlhé 0,8 – 0,9 mm a vážia 50 – 60 µg (8) (28) (obr. 1).

Obrázok 1

Samička, samček, protonymfa a larva druhu H. aculeifer.



Pri teplote 23 °C roztoče pohlavne dozrievajú po 16 dňoch (samičky) a po 18 dňoch (samčekovia) (6). Samičky prenesú spermie pomocou solenostoma, odkiaľ sa presunú k vajíčku. Vo vajíčku spermie dozrejú a uchovajú sa tam. K oplodneniu dochádza, až keď spermie vo vajíčku dozrejú. Oplodnené alebo neoplodnené vajíčka budú uložené pri samičkách v zhlukoch alebo oddelene, prevažne v prasklinách alebo otvoroch. Samičky môžu po párení nosiť juvenilných jedincov oboch pohlaví, zatiaľ čo z vajíčok samičiek, ktoré sa nepárili, sa môžu vyliahnuť výlučne samčí juvenilní jedinci. Počas vývoja k dospelosti prechádzajú roztoče štyrmi vývojovými fázami (vajíčko – larva, larva – protonymfa, protonymfa – deutonymfa, deutonymfa – dospelosť).

Vajíčko je mliečne biele, sklovité, elipsovité a približne 0,37 mm dlhé, s pevným plášťom. Podľa literatúry (8) majú larvy veľkosť 0,42 – 0,45 mm. Majú len tri páry nôh. V oblasti hlavy sa vyvíjajú tykadlá a klepietka. Na klepietkach je niekoľko malých zúbkov, ktoré sa používajú na liahnutia z vajíčka. Po prvom lienení, jeden až dva dni po vyliahnutí, sa vyvinie protonymfa. Tiež sú biele, majú veľkosť 0,45 – 0,62 mm (8) a štyri páry nôh. Zuby na klepietkach sú už

▼**M6**

úplne vyvinuté. Začínajúc týmto štádiom roztoče začínajú zháňať potravu. Z tohto dôvodu roztoč klepietkom prepichne kutikulu koristi a vstrekne do nej sekréty na trávenie. Vzniknutú kašu potom môže roztoč vysať. Klepietka sa môžu použiť aj na odtrhnutie väčších častíc z hrudiek potravy (28). Po jednom ďalšom lienení sa vyvinú deutonymfy. Sú 0,60 – 0,80 mm (8) veľké a majú žltú až svetlohnedú farbu. Od tejto fázy je možné ich rozdeliť na samičky a samčekov. Po ďalšom zvlečení, keď sú živočíchy neaktívne a vyvíja sa im hnedý štít (približne po 14 dňoch), sú roztoče dospelé (28) (29) (30). Ich životnosť je medzi 48 a 100 dní pri teplote 25 °C (27).

▼**M6**

Dodatok 8

Zhrnutie a harmonogram hlavných opatrení, ktoré sa majú prijať s cieľom vykonať test s rodom *Hypoaspis*

Čas (dni) začiatok testu = 0. deň	Činnosť/úloha
– 35. deň až – 28. deň	Samičky sa premiestnia zo zásobnej kultúry do čistých nádob, aby sa začala synchronizácia o 2 dni neskôr: premiestnenie samičiek dvakrát alebo trikrát do týždňa: poskytovať dostatok potravy
– 5. deň (+/- 2)	príprava umelej pôdy
– 4. deň (+/- 2)	stanovenie kapacity zadržiavania vody (WHC) umelo pripravenej pôdy sušenie počas noci nasledujúci deň: odvážia sa vzorky a vypočíta WHC
– 4. deň (+/- 2)	umelo pripravená pôda sa predvlhčí, aby sa dosiahla vlhkosť 20 – 30 % WHC
0. deň	začiatok testu: do umelo pripravenej pôdy sa pridá testovaná chemikália do každého replikátu sa vloží desať samičiek každý replikát sa odváži pripravia sa abiotické kontrolné vzorky na obsah vlhkosti a pH, 2 replikáty pre každú vzorku s aplikovanou chemikáliou vlhké kontrolné vzorky sa počas noci vysušia nasledujúci deň: odvážia sa vlhké kontrolné vzorky nasledujúci deň: odmeria sa pH vysušených abiotických kontrolných vzoriek
3., 6., 9., 12. deň (približne)	do každého replikátu sa pridá dostatočné množstvo organizmov ako koristi každý replikát sa odváži, prípadne sa doplní odparená voda
14. deň	ukončí sa test, začne sa extrakcia všetkých replikátov a kontrola účinnosti extrakcie počas noci sa vysuší obsah vody kontrolných vzoriek nasledujúci deň: odváži sa obsah vody v kontrolných vzorkách nasledujúci deň: odmeria sa pH vysušených kontrolných vzoriek
16. deň	ukončí sa extrakcia
po 16. dni	zaznamená sa počet dospelých a juvenilných jedincov vo vybratom materiáli výsledky sa uvedú do vzorovej tabuľky do hárkov protokolu o skúške sa zapíše postup testovania.

▼M6

C.37. 21-DŇOVÝ TEST NA RYBÁCH: KRÁTKODOBÝ SKRÍNING ESTROGÉNNEHO A ANDROGÉNNEHO PÔSOBENIA A INHIBÍCIA AROMATÁZY

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 230 (2009). Potreba vypracovať a validovať test na rybách, schopný odhaliť určité chemikálie s účinkom na endokrinný systém, vychádza z obavy, že úroveň týchto chemikálií v životnom prostredí môže mať škodlivé účinky na ľudí aj na voľne žijúce živočíchy v dôsledku pôsobenia týchto chemikálií na endokrinný systém. Organizácia OECD v roku 1998 iniciovala činnosť s vysokou prioritou s cieľom zrevidovať existujúce usmernenia a vypracovať nové usmernenia na vykonávanie skríningu a testov potenciálnych endokrinných disruptorov. Jednou zložkou tejto aktivity bolo vypracovať usmernenie na vykonávanie testov pre skríning chemikálií s účinkom na endokrinný systém určitých druhov rýb. Tento 21-dňový skríningový test endokrinného systému rýb bol podrobený rozsiahlemu programu validácie, ktorý pozostával z medzilaboratórnych štúdií s vybratými chemikáliami s cieľom preukázať význam a spoľahlivosť testu na zisťovanie chemikálií s estrogénnym pôsobením a spôsobujúcich inhibíciu aromatázy (1, 2, 3, 4, 5) na troch druhoch skúmaných rýb (čerebľa potočná, medaka japonská a dánio pruhované). Androgénne pôsobenie je možné zisťovať pri čerebli potočnej a medake japonskej, ale nie pri dániu pruhovanom. Táto testovacia metóda neumožňuje zisťovanie anti-androgénnych chemikálií. Postup validácie bol podrobený partnerskému preskúmaniu skupinou odborníkov nominovaných národnými koordinátormi programu usmernení na vykonávanie testov (6). Tento test nie je určený na identifikáciu špecifických mechanizmov hormonálneho narušenia, lebo testovacie živočíchy majú intaktnú os hypotalamus – hypofýza – gonády (HHG), ktorá môže reagovať na ovplyvňujúce chemikálie na rôznych úrovniach. Krátkodobý reprodukčný test na rybách (OECD TG 229) zahŕňa fekunditu a v prípade potreby histopatológiu gonád čereble potočnej, ako aj všetky parametre uvedené v tejto testovacej metóde. Usmernenie OECD TG 229 umožňuje skríning chemikálií, ktoré ovplyvňujú reprodukciu prostredníctvom rôznych mechanizmov vrátane endokrinných modalít. Toto by sa malo zvážiť pred výberom najvhodnejšej testovacej metódy.

2. Táto testovacia metóda opisuje skríningový test *in vivo*, v rámci ktorého sa pohlavne dospelí samčekovia a neresiace sa samičky rýb držia spolu a vystavia sa pôsobeniu chemikálie počas obmedzenej etapy ich životného cyklu (21 dní). Po ukončení 21-dňovej expozície sa pri samčekoch a samičkách merajú v závislosti od použitého druhu jeden alebo dva biomarkerové parametre ako indikátory estrogénneho alebo androgénneho pôsobenia a inhibície aromatázy testovanej chemikálie. Týmito parametrami sú vitelogenín a sekundárne pohlavné znaky. Vitelogenín sa meria pri čerebli potočnej, medake japonskej a dániu pruhovanom, zatiaľ čo sekundárne pohlavné znaky iba pri čerebli potočnej a medake japonskej.

3. Tento biologický test slúži ako skríningový test *in vivo* pre určité endokrinné mechanizmy pôsobenia a jeho použitie je potrebné posudzovať v kontexte „Koncepčného rámca OECD na testovanie a hodnotenie chemikálií ako endokrinných disruptorov“ (28).

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

4. Vitelogenín sa spravidla vytvára v pečeni samičiek vajcorodých stavovcov ako reakcia na cirkulujúci endogénny estrogén. Je to prekurzor proteínov vaječného žĺtka a po vzniku v pečeni sa krvným obehom dostáva k vaječníkom, ktoré ho prijmú a modifikujú v procese tvorby vajíčok. Vitelogenín takmer nie je možné zistiť v plazme nedospelých samičiek a samčekov rýb, pretože nemajú dostatok cirkulujúceho estrogénu. Ich pečeň je však schopná syntetizovať a vylučovať vitelogenín v reakcii na stimuláciu exogénnym estrogénom.

▼M6

5. Meranie vitelogenínu slúži na zisťovanie chemikálií s rôznymi estrogénnymi mechanizmami pôsobenia. Estrogénne chemikálie je možné zisťovať prostredníctvom merania indukcie vitelogenínu v telách samčekov rýb, čo bolo veľakrát zdokumentované v partnersky preskúmanej vedeckej literatúre [napr. (7)]. Indukcia vitelogenínu sa preukázala aj po vystavení pôsobeniu aromatizovateľných androgénov (8), (9). Zníženie úrovne cirkulácie estrogénu v telách samičiek, napríklad v dôsledku inhibície aromatázy konverziou endogénneho androgénu na prírodný estrogén 17β-estradiol, spôsobuje pokles úrovne vitelogenínu, ktorý sa používa na zisťovanie chemikálií s vlastnosťami inhibície aromatázy (10), (11). Biologický význam reakcie vitelogenínu na estrogénne pôsobenie a inhibíciu aromatázy je vo veľkej miere zdokumentovaný. Je však možné, že tvorbu vitelogenínu v telách samičiek môže ovplyvňovať aj všeobecná toxicita a iné ako endokrinné toxické mechanizmy pôsobenia, napríklad hepatotoxicita.

6. Viaceré metódy merania boli úspešne vyvinuté a štandardizované na bežné použitie. Ide o druhovo špecifické metódy enzýmového imunosorbentového stanovenia (ELISA) používajúce imunochémiu na kvantifikáciu vitelogenínu produkovaného v malých vzorkách krvi alebo pečene odobratých z jednotlivých rýb (12), (13), (14), (15), (16), (17), (18). Na meranie vitelogenínu sa odoberajú vzorky krvi čereble potočnej, krvi alebo homogenátu z hlavy/chvosta dánia pruhovaného a pečene medaky japonskej. V prípade medaky japonskej existuje dobrá korelácia medzi vitelogenínom meraným z krvi a z pečene (19). V dodatku 6 sú uvedené odporúčané postupy pre odber vzoriek na analýzu vitelogenínu. Súpravy na meranie vitelogenínu sú bežne dostupné, pričom by tieto súpravy mali byť založené na validovanej druhovo špecifickej metóde ELISA.

7. Sekundárne pohlavné znaky samčekov niektorých druhov rýb sú zvonku viditeľné, kvantifikovateľné a citlivé na cirkulujúce úrovne endogénnych androgénov. Týka sa to čereble potočnej a medaky japonskej, ale nie dánia pruhovaného, ktorý nemá kvantifikovateľné sekundárne pohlavné znaky. Samičky si udržiavajú schopnosť vývoja samčích sekundárnych pohlavných znakov, ak sú vystavené pôsobeniu androgénnych chemikálií vo vode. Vo vedeckej literatúre sú k dispozícii viaceré štúdie dokumentujúce tento typ reakcie pri jedincoch druhu čereble potočnej (20) a medaky japonskej (21). Interpretácia úbytku sekundárnych pohlavných znakov pri samčekoch by mala byť opatrná vzhľadom na nízku štatistickú významnosť a mala by byť založená na odbornom posudku a závažnosti dôkazov. Použitie dánia pruhovaného v rámci tohto testu je obmedzené, keďže nemá kvantifikovateľné sekundárne pohlavné znaky citlivé na androgénne účinky chemikálií.

8. V prípade čereble potočnej je hlavným ukazovateľom pôsobenia exogénneho estrogénu počet výrastkov (tuberkulov) nachádzajúcich sa na ústach samičiek rýb. V prípade medaky japonskej predstavuje hlavný marker exogénneho pôsobenia androgénnych chemikálií na samičky rýb počet papilárnych procesov. V dodatkoch 5A a 5B sú uvedené odporúčané postupy, ktoré treba dodržiavať v prípade hodnotenia pohlavných znakov čereble potočnej, resp. medaky japonskej.

9. Vymedzenie pojmov použité v rámci tejto testovacej metódy je uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

10. V rámci testu sa samčekovia a samičky rýb v reprodukčnom stave spoločne vystavia pôsobeniu chemikálie v testovacích nádobách. Ich stav dospelosti a reprodukčný stav umožňuje jasné rozlíšenie obidvoch pohlaví, a teda analýzu každého parametra s ohľadom na pohlavie, a zabezpečuje ich citlivosť na exogénne chemikálie. Po ukončení testu sa pohlavie potvrdí makroskopickým skúmaním gonád po ventrálnom otvorení brušnej dutiny nožnicami. Prehľad príslušných podmienok biologického testu je uvedený v dodatku 2. Test sa spravidla začína výberom vzorky rýb z populácie, ktorá je v stave neresenia, pričom by sa nemali používať senescentné

▼M6

živočíchy. Usmernenie týkajúce sa veku rýb a ich reprodukčného stavu sa uvádza v časti o výbere rýb. Test sa vykonáva s použitím troch expozičných koncentrácií chemikálie, ako aj s kontrolnou vzorkou vody, a ak je to potrebné, s kontrolnou vzorkou obsahujúcou rozpúšťadlo. V prípade medaky japonskej a dánia pruhovaného sa používajú dve nádoby alebo dva replikáty na jednu vzorku s aplikovanou chemikáliou (každá nádoba obsahuje päť samčekov a päť samičiek), zatiaľ čo v prípade čereble potočnej sa používajú štyri nádoby alebo replikáty na jednu vzorku s aplikovanou chemikáliou (každá nádoba obsahuje dvoch samčekov a štyri samičky). Ide o zohľadnenie teritoriálneho správania samčekov čereble potočnej pri súčasnom zachovaní dostatočnej významnosti testu. Expozícia trvá 21 dní a odber vzoriek rýb sa vykoná v 21. deň expozície.

11. Pre odber vzoriek v 21. deň sa všetky živočíchy usmrtia humánnym spôsobom. Druhotné pohlavné znaky sa zisťujú pri čerebli potočnej a medake japonskej (pozri dodatok 5A a dodatok 5B). Na stanovenie vitelogenínu v tele dánia pruhovaného a čereble potočnej sa odoberú vzorky krvi, pričom alternatívne sa na stanovenie vitelogenínu v tele dánia pruhovaného môžu odobrať hlavy/chvosty (dodatok 6). Na analýzu vitelogenínu v tele medaky japonskej sa odoberie pečeň (dodatok 6).

KRITÉRIÁ PRIJATEĽNOSTI TESTU

12. Na to, aby boli výsledky testu prijateľné, musia byť splnené tieto podmienky:

— úmrtnosť v kontrolných vzorkách s vodou (alebo s rozpúšťadlom) na konci obdobia expozície by nemala prekročiť hodnotu 10 %,

— koncentrácia rozpusteného kyslíka by mala počas expozície dosahovať najmenej 60 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka,

— teplota vody by sa v žiadnom okamihu počas expozície nemala líšiť o viac ako ± 1,5 °C medzi testovacími nádobami a mala by sa udržiavať v rozsahu 2 °C v rámci teplotných rozsahov špecifikovaných pre daný testovací druh (dodatok 2),

— malo by byť preukázateľné, že koncentrácia testovanej chemikálie v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v rozsahu ± 20 % stredných nameraných hodnôt.

OPIS METÓDY

Zariadenie

13. Obvyklé laboratórne vybavenie a najmä tieto zariadenia:

a) zariadenie na meranie kyslíka a pH meter;

b) zariadenie na stanovenie tvrdosti a alkality vody;

c) vhodné zariadenie na reguláciu teploty a podľa možnosti na kontinuálne monitorovanie;

d) nádrže z chemicky inertného materiálu a s vhodným objemom v súvislosti s odporúčanou veľkosťou násady a chovnou hustotou (pozri dodatok 2);

e) substrát na neresenie pre čerebľu potočnú a dánio pruhované (potrebné údaje sú uvedené v dodatku 4);

f) vhodné presné váhy (t. j. s presnosťou do ± 0,5 mg).

▼M6

Voda

14. Použiteľná voda na testovvanie je každá voda, v ktorej testovací druh vykazuje vhodné dlhotrvajúce prežívanie a rast. Mala by mať konštantnú kvalitu počas celého testu. Hodnota pH vody by mala byť v rozsahu 6,5 – 8,5, ale počas daného testu by mala byť v rozsahu ± 0,5 jednotky pH. S cieľom zabezpečiť, aby riediaca voda nemala prílišný vplyv na výsledok testu (napr. tvorbou komplexu testovanej chemikálie), by sa vzorky mali odoberať v intervaloch počas analýzy. Ak je známe, že riediaca voda bude mať pomerne konštantnú kvalitu, zisťovanie ťažkých kovov (napr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd a Ni), hlavných aniónov a katiónov (napr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} a $SO4^{2-}$), pesticídov (napr. celkového obsahu organofosforečných a organochlórových pesticídov), celkového organického uhlíka a suspendovaných tuhých látok by sa malo vykonávať napríklad každé tri mesiace. Ak sa preukázalo, že kvalita vody je stabilná najmenej počas jedného roka, merania sa môžu vykonávať menej často a časové intervaly medzi nimi sa môžu predĺžiť (napr. každých šesť mesiacov). Niektoré chemické vlastnosti vody vhodnej na riedenie sú uvedené v zozname v dodatku 3.

Testovacie roztoky

15. Testovacie roztoky vybratých koncentrácií sa pripravujú riedením zásobných roztokov. Zásobný roztok by sa mal podľa možností pripraviť jednoduchým miešaním alebo trepaním testovanej chemikálie v riediacej vode mechanickým prostriedkom (napr. miešadlom alebo ultrazvukom). Na dosiahnutie vhodne koncentrovaných zásobných roztokov sa môžu použiť saturačné kolóny (rozpúšťacie kolóny). Použitie rozpúšťadla ako nosiča sa neodporúča. Ak je však rozpúšťadlo potrebné, mali by sa súbežne pripraviť kontrolné vzorky s rozpúšťadlom, s rovnakou koncentráciou rozpúšťadla, aká je vo vzorkách s aplikovanou chemikáliou. V prípade zložitých testovaných chemikálií môže byť rozpúšťadlo technicky najlepším riešením, je však potrebné riadiť sa usmerňovacím dokumentom OECD o testovaní toxicity zložitých látok a zmesí vo vodnom prostredí (22). Výber rozpúšťadla bude daný chemickými vlastnosťami chemikálie. V usmerňovacom dokumente OECD sa odporúča maximálna hodnota 100 µl/l, ktorá by sa mala dodržiavať. Nedávny prieskum (23) však poukázal na ďalšie problémy pri používaní rozpúšťadiel v rámci testovania endokrinného pôsobenia. Preto sa v prípadoch, keď je použitie rozpúšťadla potrebné, odporúča minimalizovať jeho koncentráciu všade tam, kde je to technicky možné (v závislosti od fyzikálno-chemických vlastností testovanej chemikálie).

16. Používať sa bude prietokový testovací systém. Takýmto systémom sa kontinuálne rozdeľuje a riedi zásobný roztok testovanej chemikálie (napr. dávkovacími meracími čerpadlami, proporcionálnym zrieďovačom, saturačným systémom) s cieľom dodať rad koncentrácií do testovacích komôr. Prietoky zásobných roztokov a riediacej vody by sa mali počas testu kontrolovať v intervaloch, najlepšie denne, a ich hodnoty by sa nemali v priebehu celého testu meniť o viac ako 10 %. Pozornosť by sa mala venovať tomu, aby sa nepoužívali potrubia z plastov s nízkym stupňom kvality alebo z iných materiálov, ktoré môžu obsahovať biologicky aktívne chemikálie. Pri výbere materiálu na prietokový systém by sa mala zvážiť možná adsorpcia testovanej chemikálie na tento materiál.

Uchovávanie rýb

17. Testovacie ryby by sa mali vyberať z laboratórnej populácie, podľa možnosti z jednej zásoby, ktorá sa aklimatizovala najmenej dva týždne pred testom v podobných podmienkach, pokiaľ ide o kvalitu vody a osvetlenie, aké sa použijú v rámci testu. Je dôležité, aby veľkosť násady a chovná hustota (vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 1) boli vhodné pre použitý testovací druh (pozri dodatok 2).

18. Po 48-hodinovej privykacej (adaptačnej) fáze sa zaznamená mortalita a uplatnia sa tieto kritériá:

▼M6

— úmrtnosť za sedem dní prevyšuje 10 % populácie: celá násada sa vyradí,

— úmrtnosť je 5 – 10 % populácie: aklimatizovať ďalších sedem dní; ak je úmrtnosť počas ďalších siedmich dní vyššia ako 5 %, celá násada sa vyradí,

— úmrtnosť za sedem dní je nižšia ako 5 % populácie: násada sa akceptuje.

19. Ryby by nemali byť podrobené liečeniu chorôb počas aklimatizácie, v období pred expozíciou, ani počas expozície.

Obdobie pred expozíciou a výber rýb

20. Odporúča sa, aby sa živočíchy umiestnili do nádob podobných tým, ktoré sa použijú v rámci skutočného testu, na obdobie jedného týždňa pred expozíciou. Ryby by sa mali kŕmiť *ad libitum* počas celého obdobia uchovávania a počas fázy expozície. Fáza expozície sa začína s pohlavne dimorfnými dospelými rybami z laboratórnej zásoby reprodukčne zrelých živočíchov (napr. s jasne viditeľnými sekundárnymi pohlavnými znakmi v prípade čereble potočnej a medaky japonskej) vo fáze aktívneho neresenia.Tieto údaje slúžia iba ako všeobecné usmernenie (a nemali by sa brať do úvahy izolovane od pozorovania skutočného reprodukčného stavu danej násady rýb). Čereble potočné by mali byť približne v 20. (± 2) týždni života, za predpokladu, že počas celého života boli kultivované pri teplote 25 ± 2 °C. Medaky japonské by mali byť približne v 16. (± 2) týždni života, za predpokladu, že počas celého života boli kultivované pri teplote 25 ± 2 °C. Medaky japonské by mali byť približne v 16. (± 2) týždni života, za predpokladu, že počas celého života boli kultivované pri teplote 26 ± 2 °C.

KONCEPCIA TESTU

21. Používajú sa tri koncentrácie testovanej chemikálie, jedna kontrolná vzorka (voda), a ak je to potrebné, jedna kontrolná vzorka s rozpúšťadlom. Údaje je možné analyzovať s cieľom určiť štatisticky významné rozdiely medzi reakciami vo vzorkách s aplikovanou chemikáliou a v kontrolných vzorkách. Tieto analýzy poskytnú informáciu, či je potrebné ďalšie dlhodobejšie testovanie nepriaznivých účinkov (najmä na prežitie, rozvoj, rast a reprodukciu) skôr pre chemikáliu, než na účely hodnotenia rizika (24).

22. V prípade dánia pruhovaného a medaky japonskej sa v 21. deň testu z tiel samčekov a samičiek na každej úrovni aplikácie chemikálie (päť samčekov a päť samičiek v každom z dvoch replikátov) a v kontrolných skupinách odoberú vzorky na meranie vitelogenínu a sekundárnych pohlavných znakov, podľa potreby. V prípade čereble potočnej sa v 21. deň expozície z tiel samčekov a samičiek (dvaja samčekovia a štyri samičky v každom zo štyroch replikátov) a v kontrolných skupinách odoberú vzorky na stanovenie vitelogenínu a sekundárnych pohlavných znakov.

Výber testovacích koncentrácií

23. Na účely tohto testu by sa mala stanoviť najvyššia testovacia koncentrácia vo výške maximálnej tolerovanej koncentrácie (MTC), ktorá sa určí pomocou testu na zistenie rozsahu alebo z iných údajov o toxicite, alebo vo výške 10 mg/l, alebo na základe maximálnej rozpustnosti vo vode, podľa toho, ktorá hodnota je najnižšia. MTC sa vymedzuje ako najvyššia testovacia koncentrácia chemikálie, ktorá spôsobuje úmrtnosť nižšiu ako 10 %. Pri tomto prístupe sa predpokladá, že existujú empirické údaje o akútnej toxicite alebo iné údaje o toxicite, na základe ktorých je možné odhadnúť hodnotu MTC. Odhad hodnoty MTC môže byť nepresný a spravidla sa vyžaduje určitý odborný posudok.

▼M6

24. Potrebné sú tri testovacie koncentrácie s konštantným faktorom rozstupu nepresahujúcim hodnotu 10 a kontrolná vzorka s riediacou vodou (v prípade potreby aj kontrolná vzorka s rozpúšťadlom). Odporúča sa celá škála faktorov rozstupu s hodnotami od 3,2 do 10.

POSTUP

Výber a váženie testovacích rýb

25. Je dôležité hneď na začiatku testu minimalizovať odchýlky v hmotnosti rýb. Vhodné rozsahy veľkosti rýb na použitie v rámci tohto testu pre rôzne druhy sú uvedené v dodatku 2. Pre celú násadu rýb použitých v rámci testu platí, že rozsah individuálnych hmotností samčekov a samičiek na začiatku testu by sa mal udržiavať podľa možnosti v rozsahu ± 20 % aritmetickej strednej hodnoty hmotnosti jedincov rovnakého pohlavia. Odporúča sa odvážiť aj čiastkovú vzorku zásoby rýb pred testom, aby bolo možné odhadnúť strednú hmotnosť.

Podmienky expozície

Trvanie

26. Test trvá 21 dní nasledujúcich po období pred expozíciou. Odporúčané obdobie pred expozíciou je jeden týždeň.

Kŕmenie

27. Ryby by sa mali kŕmiť *ad libitum* vhodnou potravou (dodatok 2) v dostatočnom množstve, aby sa udržiaval ich telesný stav. Treba dbať na to, aby sa predišlo rastu mikroorganizmov a zákalu vody. Ako všeobecné usmernenie platí, že denná dávka môže byť rozdelená do dvoch alebo troch rovnakých porcií podávaných vo viacerých kŕmeniach za deň, oddelene, najmenej s trojhodinovými prestávkami. Jedna väčšia porcia je prijateľná najmä počas víkendov. Ryby sa nekŕmia počas 12 hodín pred odberom vzoriek/pitvou.

28. Potrava pre ryby by sa mala hodnotiť z hľadiska prítomnosti kontaminantov, ako sú organochlórové pesticídy, polycyklické aromatické uhľovodíky, polychlórované bifenyly. Vylúčiť by sa mala potrava so zvýšenou úrovňou fytoestrogénov, ktorá by ovplyvnila reakciu pri teste na známe agonisty estrogénu (napr. 17-beta estradiol).

29. Nezožratá potrava a fekálny materiál by sa mali odstraňovať z testovacích nádob najmenej dvakrát týždenne, napríklad dôkladným vyčistením dna každej nádrže pomocou odsávania.

Svetlo a teplota

30. Fotoperióda a teplota vody by mali byť vhodné pre dané testovacie druhy (dodatok 2).

Frekvencia analytických stanovení a meraní

31. Pred začiatkom času expozície je potrebné zabezpečiť riadne fungovanie systému prísunu chemikálie. Pripraviť by sa mali všetky potrebné analytické metódy vrátane dostatočných vedomostí o chemickej stabilite v testovacom systéme. Počas testu sa koncentrácie testovanej chemikálie určujú v pravidelných časových intervaloch takto: prietoky riedidla a zásobného roztoku toxickej látky by sa mali kontrolovať podľa možnosti denne, ale minimálne dvakrát za týždeň, a nemali by sa počas celého testu meniť viac ako o 10 %. Odporúča sa merať skutočné koncentrácie testovanej chemikálie vo všetkých nádobách na začiatku testu a potom v týždenných intervaloch.

32. Odporúča sa, aby výsledky vychádzali z nameraných koncentrácií. V prípade, že koncentrácia testovanej chemikálie v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v rozsahu ± 20 % nominálnej koncentrácie počas celého testu, výsledky môžu vychádzať buď z nominálnych, alebo z nameraných hodnôt.

33. Vzorky môže byť potrebné filtrovať (napr. pomocou filtra s veľkosťou pórov 0,45 μm) alebo odstreďovať. V prípade potreby je odstreďovanie odporúčaným postupom. Ak sa však testovaný materiál neabsorbuje na filtri, aj filtrácia je prijateľná.

▼M6

34. Počas testu by sa najmenej raz za týždeň mala merať koncentrácia rozpusteného kyslíka, teplota a hodnota pH vo všetkých testovacích nádobách. Najmenej raz za týždeň by sa mala merať celková tvrdosť vody a alkalita v kontrolných nádobách a v jednej nádobe s najvyššou koncentráciou. Teplota by sa mala podľa možnosti monitorovať kontinuálne aspoň v jednej testovacej nádobe.

Pozorovania

35. V priebehu alebo na konci testu sa posudzujú viaceré všeobecné reakcie (napr. prežitie) a základné biologické reakcie (napr. úroveň vitelogenínu). Meranie a hodnotenie týchto parametrov a ich využitie sú opísané v ďalších bodoch.

Prežitie

36. Ryby by sa mali počas testovacieho obdobia denne kontrolovať, každý úhyn by sa mal zaznamenať a uhynutá ryba čo najskôr odstrániť. Mŕtve ryby by sa nemali nahrádzať ani v kontrolných nádobách, ani v nádobách s aplikovanou chemikáliou. Pohlavie rýb, ktoré uhynuli počas testu, by sa malo určiť makroskopickým hodnotením gonád.

Správanie a vzhľad

37. Akékoľvek abnormálne správanie (v porovnaní s kontrolnými vzorkami) by sa malo zaznamenať. Môže ísť o príznaky všeobecnej toxicity vrátane hyperventilácie, nekoordinovaného plávania, straty rovnováhy a atypickej nehybnosti alebo kŕmenia. Okrem toho by sa mali zaznamenať aj vonkajšie abnormality (ako napríklad krvácanie, strata farby). Takéto príznaky toxicity by sa mali starostlivo zvážiť pri interpretácii údajov, lebo môžu naznačovať existenciu koncentrácií, pri ktorých biomarkery endokrinného pôsobenia nie sú spoľahlivé. Takéto pozorovania správania môžu poskytovať aj užitočné kvalitatívne informácie na vypracovanie potenciálnych budúcich požiadaviek na vykonávanie testov s rybami. Napríklad v prípade normálnych samčekov a maskulinizovaných samičiek čereble potočnej, vystavených androgénnemu pôsobeniu, bola pozorovaná teritoriálna agresivita. V prípade dánia pruhovaného sa po vystavení estrogénnemu alebo anti-androgénnemu pôsobeniu znižuje alebo spomaľuje charakteristická aktivita pri párení a neresení.

38. Keďže niektoré aspekty vzhľadu (predovšetkým farba) sa môžu rýchlo zmeniť pri manipulácii, je dôležité, aby sa kvalitatívne pozorovania vykonávali pred odstránením živočíchov z testovacieho systému. Doterajšie skúsenosti s druhom čereble potočnej naznačujú, že niektoré chemikálie s účinkom na endokrinný systém môžu najskôr vyvolať zmeny týchto vonkajších znakov: farba tela (svetlá alebo tmavá), vzorované sfarbenie (prítomnosť zvislých pruhov) a tvar tela (hlavová a prsná oblasť). Pozorovania fyzického vzhľadu rýb by sa preto mali vykonávať v priebehu celého testu a na záver štúdie.

Humánne usmrcovanie rýb

39. V 21. deň, t. j. po ukončení expozície, by sa ryby mali usmrtiť primeraným množstvom trikaínu [trikaín metán sulfonát, Metacain, MS-222 (CAS 886-86-2)], 100 – 500 mg/l, tlmeného pridaním 300 mg/l $NaHCO_3$ (bikarbonát sodný, CAS 144-55-8) na zníženie podráždenia slizníc. Potom sa odoberú vzorky krvi alebo tkaniva na stanovenie vitelogenínu, ako je vysvetlené v príslušnej časti.

▼M6

Pozorovanie sekundárnych pohlavných znakov

40. Niektoré chemikálie s účinkom na endokrinný systém môžu vyvolávať zmeny špecializovaných sekundárnych pohlavných znakov (počet tuberkulov pri samčekoch čereble potočnej, papilárnych procesov pri samčekoch medaky). Najmä chemikálie s určitými mechanizmami pôsobenia môžu vyvolávať abnormálny výskyt sekundárnych pohlavných znakov pri živočíchoch opačného pohlavia, napríklad agonisty androgénových receptorov, ako sú trenbolón, metyltestosterón a dihydrotestosterón, môžu spôsobovať vyvinutie výrazných tuberkulov pri samičkách čereble potočnej alebo papilárnych procesov pri samičkách medaky (11), (20), (21). Uvádza sa tiež, že agonisty estrogénových receptorov môžu znížiť počet tuberkulov a veľkosť záhlavnej časti chrbta pri dospelých samčekoch (25), (26). Takéto celkové morfologické pozorovania môžu poskytovať užitočné kvalitatívne a kvantitatívne informácie na vypracovanie potenciálnych budúcich požiadaviek na vykonávanie testov s rybami. Počet a veľkosť tuberkulov pri čerebli potočnej a papilárnych procesov pri medake je možné kvantifikovať priamo alebo praktickejšie na konzervovaných exemplároch. V dodatkoch 5A a 5B sú uvedené odporúčané postupy na hodnotenie sekundárnych pohlavných znakov čereble potočnej, resp. medaky.

Vitelogenín (VTG)

41. Krv sa odoberá z chvostovej tepny/žily pomocou heparinizovanej mikrohematokritovej kapilárnej kanyly, alebo alternatívne srdcovou punkciou pomocou striekačky. V závislosti od veľkosti rýb sa objem krvi, ktorú je možné odobrať, vo všeobecnosti pohybuje v rozmedzí 5 – 60 µl na jeden exemplár čereble potočnej a 5 – 15 µl na jeden exemplár dánia pruhovaného. Plazma sa oddelí od krvi odstredením a uchová sa s inhibítorom proteázy pri teplote – 80 °C, pokým nebude analyzovaná na prítomnosť vitelogenínu. Alternatívne sa ako zdroj tkaniva na stanovenie vitelogenínu použije pečeň v prípade medaky a homogenát z hlavy/chvosta v prípade dánia pruhovaného (dodatok 6). Meranie vitelogenínu by malo byť založené na validovanej homologickej metóde ELISA, s použitím homologického štandardu vitelogenínu a homologických protilátok. Odporúča sa použiť metódu, pomocou ktorej je možné zistiť množstvo vitelogenínu na úrovni niekoľkých ng/ml plazmy (alebo ng/mg tkaniva), čo je úroveň pozadia v tele samčekov rýb bez aplikovanej chemikálie.

42. Kontrola kvality analýzy vitelogenínu sa vykoná s použitím štandardov, slepých vzoriek a aspoň dvojitej analýzy. Pre každú metódu ELISA by sa mal pri určovaní minimálneho faktora riedenia vzorky vykonať test na matricový efekt (efekt zriedenia vzorky). Každá platnička ELISA používaná v rámci testov na zistenie vitelogenínu by mala obsahovať tieto vzorky na kontrolu kvality: najmenej šesť kalibračných štandardov zahŕňajúcich rozsah očakávaných koncentrácií vitelogenínu a najmenej jednu nešpecifickú viazanú testovaciu slepú vzorku (analyzuje sa duplicitne). Absorbancia týchto slepých vzoriek by mala byť nižšia ako 5 % maximálnej absorbancie kalibračného štandardu. Analyzovať sa budú najmenej dve alikvotné časti (paralelné) každého zriedenia vzorky. Paralelné vzorky, ktoré sa líšia o viac ako 20 %, by sa mali opätovne analyzovať.

43. Korelačný koeficient (R^2) pre kalibračné krivky by mal byť väčší ako 0,99. Vysoká korelácia však nie je dostatočná na to, aby sa zaručilo primerané predvídanie koncentrácie vo všetkých rozsahoch. Okrem dostatočne vysokej korelácie pre kalibračnú krivku by koncentrácia každého štandardu, ktorá sa vypočíta z kalibračnej krivky, mala ležať v rozsahu 70 – 120 % nominálnej koncentrácie. Ak sa nominálne koncentrácie odkláňajú od kalibračnej

▼M6

regresnej priamky (napr. pri nižších koncentráciách), môže byť nevyhnutné rozdeliť kalibračnú krivku na nízky a vysoký rozsah, alebo použiť nelineárny model, ktorý primerane zodpovedá údajom o absorbancii. Ak sa krivka rozdelí, obidve jej časti by mali mať $R^2 > 0,99$.

44. Detekčný limit (LOD) je vymedzený ako koncentrácia najnižšieho analytického štandardu a limit kvantifikácie (LOQ) je vymedzený ako súčin koncentrácie najnižšieho analytického štandardu a najnižšieho faktora riedenia.

45. Každý deň, keď sa vykonávajú testy na zistenie vitelogenínu, sa budú analyzovať obohatené vzorky s použitím referenčnej látky-štandard (dodatok 7). Spolu s výsledkami z každého súboru testov vykonaných v tento deň sa uvádza pomer očakávanej koncentrácie a nameranej koncentrácie.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Vyhodnocovanie reakcií biomarkerov pomocou analýzy rozptylu (ANOVA)

46. Na zistenie potenciálneho endokrinného pôsobenia chemikálie sa porovnávajú reakcie v skupinách s aplikovanou chemikáliou a reakcie v kontrolných skupinách pomocou analýzy rozptylu (ANOVA). Ak sa použije kontrolná vzorka s rozpúšťadlom, mali by sa pre každý parameter vykonať vhodné štatistické testy na porovnanie kontrolných vzoriek s riedenou vodou a kontrolných vzoriek s rozpúšťadlom. Usmernenia k spôsobu použitia údajov z kontrolných vzoriek s riedenou vodou a kontrolných vzoriek s rozpúšťadlom v následnej štatistickej analýze je možné nájsť v dokumente OECD 2006c (27). Všetky údaje o biologických reakciách by sa mali analyzovať a uvádzať osobitne podľa pohlavia. Ak sa nesplnia požadované predpoklady parametrických metód – iné ako normálne rozdelenie (napr. Shapiro-Wilkov test) alebo heterogénny rozptyl (Barlettov test), je potrebné zvážiť transformovanie údajov pred vykonaním analýzy ANOVA tak, aby sa dosiahli homogénne rozptyly, alebo vykonanie váženej ANOVA. V prípade nemonotónnej závislosti reakcie od dávky sa môže použiť Dunnettov test (parametrický) na viacnásobné párové porovnávanie alebo Mannov-Whitneyho test s Bonferroniho úpravou (neparametrický). Ak je závislosť reakcie od dávky približne monotónna, môžu sa použiť iné štatistické testy (napr. Jonckheereho-Terpstrov test alebo Williamsov test). V dodatku 8 je uvedený štatistický diagram, ktorý má pomôcť pri rozhodovaní o najvhodnejšom štatistickom teste na použitie. Doplnkové informácie je možné získať aj z dokumentu OECD o súčasných prístupoch v štatistickej analýze údajov o ekotoxicite (27).

Podávanie správ o výsledkoch testu

47. Údaje štúdie by mali zahŕňať:

Testovacie zariadenie:

— zodpovední pracovníci a ich úlohy v rámci štúdie,

— každé laboratórium preukáže odbornosť v používaní škály reprezentatívnych chemikálií.

Testovaná chemikália:

— charakteristika testovanej chemikálie,

— fyzikálny charakter a dôležité fyzikálno-chemické vlastnosti,

▼M6

— metóda a frekvencia prípravy testovacích koncentrácií,

— informácie o stabilite a biodegradovateľnosti.

Rozpúšťadlo:

— charakteristika rozpúšťadla (povaha, použitá koncentrácia),

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla (ak je iné ako voda).

Testovacie živočíchy:

— druh a kmeň,

— dodávateľ a konkrétne zariadenie dodávateľa,

— vek rýb na začiatku testu a stav reprodukcie/neresenia,

— údaje o postupe aklimatizácie živočíchov,

— telesná hmotnosť rýb na začiatku expozície (z podvzorky populácie rýb).

Podmienky testu:

— použitý postup testovania (druh testu, stupeň zaťaženia, chovná hustota atď.),

— metóda prípravy zásobných roztokov a prietok,

— nominálne testovacie koncentrácie, týždenne merané koncentrácie testovacích roztokov a použitá analytická metóda, stredné namerané hodnoty a štandardné odchýlky v testovacích nádobách a dôkaz o tom, že merania zodpovedajú koncentráciám testovanej chemikálie v skutočnom roztoku,

— charakteristiky riediacej vody (vrátane pH, tvrdosti, alkality, teploty, koncentrácie rozpusteného kyslíka, úrovne reziduálneho chlóru, celkového organického uhlíka, suspendovaných tuhých látok a výsledkov akýchkoľvek iných vykonaných meraní),

— kvalita vody v testovacích nádobách: pH, tvrdosť, teplota a koncentrácia rozpusteného kyslíka,

— podrobné informácie o kŕmení [napr. druh potravy, zdroj, dávkované množstvo a frekvencia a analýza príslušných kontaminantov (napr. polychlórované bifenyly, polycyklické aromatické uhľovodíky a organochlórové pesticídy), ak je k dispozícii].

Výsledky

— dôkaz, že kontrolné vzorky splnili kritériá prijateľnosti testu,

— údaje o úmrtnosti vyskytujúcej sa pri každej z testovacích koncentrácií a v kontrolnej vzorke,

— používané štatistické analytické techniky, spracovanie údajov a odôvodnenie použitia daných techník,

— údaje o biologických pozorovaniach celkovej morfológie vrátane sekundárnych pohlavných znakov a vitelogenínu,

▼M6

— výsledky analýz údajov, najlepšie v tabuľkovej a grafickej forme,

— výskyt akýchkoľvek neobvyklých reakcií rýb a akýchkoľvek viditeľných účinkov vyvolaných testovanou chemikáliou.

USMERNENIE PRE INTERPRETÁCIU A AKCEPTÁCIU VÝSLEDKOV TESTU

48. Táto časť obsahuje niekoľko aspektov, ktoré treba brať do úvahy pri interpretácii výsledkov testu pre jednotlivé merané parametre. Výsledky by sa mali interpretovať opatrne, ak sa zdá, že testovaná chemikália má zjavné toxické účinky alebo ovplyvňuje celkový stav testovacieho živočícha.

49. S cieľom umožniť zmysluplnú interpretáciu údajov je potrebné pri stanovení rozsahu testovacích koncentrácií dbať na to, aby sa neprekročila maximálna tolerovaná koncentrácia. Je dôležité mať najmenej jednu vzorku s aplikovanou chemikáliou, v ktorej nie sú žiadne príznaky toxických účinkov. Príznaky choroby a príznaky toxických účinkov by sa mali dôkladne vyhodnotiť a zaznamenať. Je napríklad možné, že produkciu vitelogenínu v telách samičiek môže ovplyvňovať aj všeobecná toxicita a neendokrinné toxické mechanizmy pôsobenia, napríklad hepatotoxicita. Interpretáciu účinkov však môžu podporiť iné množstvá aplikovanej chemikálie, ktoré nie je možné si pomýliť so systémovou toxicitou.

50. Existuje niekoľko aspektov, ktoré treba brať do úvahy pri akceptácii výsledkov testu. Ako usmernenie platí, že úrovne vitelogenínu v kontrolných skupinách samčekov a samičiek by mali byť odlišné a líšiť by sa mali približne o tri rádové hodnoty v prípade čereble potočnej a dánia pruhovaného a približne o jeden rád v prípade medaky. Príklady rozsahu hodnôt, ktoré sa vyskytli v kontrolných skupinách a v skupinách s aplikovanou chemikáliou, sú k dispozícii vo validačných správach (1), (2), (3), (4). Vysoké hodnoty vitelogenínu pri samčekoch v kontrolných skupinách by mohli ohroziť citlivosť testu a jeho schopnosť odhaliť slabé agonisty estrogénu. Nízke hodnoty vitelogenínu pri samičkách v kontrolných skupinách by mohli ohroziť citlivosť testu a jeho schopnosť odhaliť inhibítory aromatázy a antagonisty estrogénu. Na vypracovanie tohto usmernenia sa použili validačné štúdie.

51. Ak laboratórium predtým nevykonávalo tento test alebo nastali podstatné zmeny (napr. zmena kmeňa rýb alebo dodávateľa), je vhodné realizovať štúdiu technickej spôsobilosti. Odporúča sa použitie chemikálií, ktoré zahŕňajú rôzne mechanizmy pôsobenia alebo vplyvu na viaceré parametre testu. V praxi sa každému laboratóriu odporúča, aby si budovalo svoju vlastnú databázu historických kontrolných údajov pre samčekov a samičky a aby používalo pozitívnu kontrolnú chemikáliu na estrogénne pôsobenie (napr. 17β-estradiol, 100 ng/l, alebo známe slabé agonisty), ktoré vedie k zvýšeniu množstva vitelogenínu v telách samčekov rýb, pozitívnu kontrolnú chemikáliu na inhibíciu aromatázy (napr. fadrozol alebo prochloraz, 300 µg/l), ktorá vedie k zníženiu množstva vitelogenínu v telách samičiek rýb, a pozitívnu kontrolnú chemikáliu na androgénne pôsobenie (napr. 17β-trenbolón, 5 µg/l), ktoré vedie k vzniku sekundárnych pohlavných znakov pri samičkách čereble potočnej a medaky. Všetky tieto údaje je možné porovnať s dostupnými údajmi z validačných štúdií (1), (2), (3), aby sa zabezpečila odbornosť laboratória.

52. Vo všeobecnosti by sa malo meranie vitelogenínu považovať za pozitívne, ak existuje štatisticky významné zvýšenie množstva vitelogenínu v telách samčekov ($p < 0,05$) alebo štatisticky významný pokles v telách samičiek ($p < 0,05$) v porovnaní s kontrolnou skupinou, aspoň pri najvyššej testovacej dávke, a ak sa nevyskytnú príznaky všeobecnej toxicity. Pozitívny výsledok ďalej podporí preukázanie biologicky hodnoverného vzťahu medzi dávkou a reakciou. Ako už bolo uvedené, pokles množstva vitelogenínu nemusí mať výlučne endokrinný pôvod. Pozitívny výsledok by sa však mal vo všeobecnosti interpretovať ako dôkaz endokrinného pôsobenia *in vivo* a mal by spravidla viesť k opatreniam na ďalšie objasnenie.

▼**M6**

LITERATÚRA

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 (accessed 18/09/08).

5. US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Unpublished report dated 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. s. 104.

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 a 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, Brusel, Belgicko.

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; vol 21: 1699 – 1708.

18. Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang IJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). Jpn J Environ Toxicol 4:87 – 98.

19. Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M a 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. Paríž.

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; s. 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 17β-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 a 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

Dodatok 1

Skratky a vymedzenie pojmov

Chemikália: látka alebo zmes.

CV: variačný koeficient.

ELISA: enzýmové imunosorbentové stanovenie.

Stupeň zaťaženia: čerstvá hmotnosť rýb na objem vody.

Chovná hustota: počet rýb na objem vody.

Vitelogenín (VTG): fosfolipoglykoproteín, slúžiaci ako prekurzor proteínov vaječného žĺtka, ktorý sa normálne vyskytuje v telách pohlavne aktívnych samičiek všetkých vajcorodých druhov.

Os HHG (HPG): os hypothalamus – hypofýza – gonády (hypothalamic-pituitary-gonadal).

MTC (maximum tolerated concentration): maximálna tolerovaná koncentrácia, ktorá predstavuje približne 10 % hodnoty LC_{50}.

Testovaná chemikália: je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

▼**M6**

Dodatok 2

Experimentálne podmienky skríningového testu na endokrinnom systéme rýb

1. Odporúčaný druh	**Čerebľa potočná** (*Pimephales promelas*)	**Medaka** (*Oryzias latipes*)	**Dánio pruhované** (*Danio rerio*)
2. Druh testu	prietokový	prietokový	prietokový
3. Teplota vody	25 ± 2°C	25 ± 2°C	26 ± 2°C
4. Kvalita osvetlenia	Žiarivky (široké spektrum)	Žiarivky (široké spektrum)	Žiarivky (široké spektrum)
5. Intenzita svetla	10 – 20 μE/m^2/s, 540 – 1 000 luxov alebo 50 – 100 ft-c (úrovne v laboratórnom prostredí)	10 – 20 μE/m^2/s, 540 – 1 000 luxov alebo 50 – 100 ft-c (úrovne v laboratórnom prostredí)	10 – 20 μE/m^2/s, 540 – 1 000 luxov alebo 50 – 100 ft-c (úrovne v laboratórnom prostredí)
6. Fotoperióda (možné sú prechody svitania/súmraku, ale nepovažujú sa za nutné)	16 hodín svetla a 8 hodín tmy	12 – 16 hodín svetla a 12 – 8 hodín tmy	12 – 16 hodín svetla a 12 – 8 hodín tmy
7. Stupeň zaťaženia	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Veľkosť skúšobnej komory	10 l (minimálne)	2 l (minimálne)	5 l (minimálne)
9. Objem testovacieho roztoku	8 l (minimálne)	1,5 l (minimálne)	4 l (minimálne)
10. Výmeny objemu testovacích roztokov	minimálne 6 denne	minimálne 5 denne	minimálne 5 denne
11. Vek testovacích organizmov	pozri bod 20	pozri bod 20	pozri bod 20
12. Približná mokrá hmotnosť dospelých rýb (g)	samičky: 1,5 ± 20 % samčekovia: 2,5 ± 20 %	samičky: 0,35 ± 20 % samčekovia: 0,35 ± 20 %	samičky: 0,65 ± 20 % samčekovia: 0,4 ± 20 %
13. Počet rýb v každej testovacej nádobe	6 (2 samčekovia a 4 samičky)	10 (5 samčekov a 5 samičiek)	10 (5 samčekov a 5 samičiek)
14. Počet vzoriek s aplikovanou chemikáliou	= 3 (plus primerané kontrolné vzorky)	= 3 (plus primerané kontrolné vzorky)	= 3 (plus primerané kontrolné vzorky)
15. Počet nádob na každú aplikáciu chemikálie	minimálne 4	minimálne 2	minimálne 2
16. Počet rýb na každú testovanú koncentráciu	16 dospelých samičiek a 8 samčekov (4 samičky a 2 samčekovia v každej replikačnej nádobe)	10 dospelých samičiek a 10 samčekov (5 samičiek a 5 samčekov v každej replikačnej nádobe)	10 dospelých samičiek a 10 samčekov (5 samičiek a 5 samčekov v každej replikačnej nádobe)
17. Kŕmny režim	živé alebo mrazené dospelé jedince alebo larvy žiabronôžky soľnej, dva- alebo trikrát denne (*ad libitum*), komerčne dostupná potrava, alebo kombinácia uvedeného	larvy žiabronôžky soľnej, dva- alebo trikrát denne (*ad libitum*), komerčne dostupná potrava, alebo kombinácia uvedeného	larvy žiabronôžky soľnej, dva- alebo trikrát denne (*ad libitum*), komerčne dostupná potrava, alebo kombinácia uvedeného

▼**M6**

18. Prevzdušňovanie	žiadne, pokiaľ koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesne pod 60 % hodnoty saturácie vzduchom	žiadne, pokiaľ koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesne pod 60 % hodnoty saturácie vzduchom	žiadne, pokiaľ koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesne pod 60 % hodnoty saturácie vzduchom
19. Riediaca voda	s čistým povrchom, studňová alebo rekonštituovaná voda alebo odchlórovaná voda z vodovodu	s čistým povrchom, studňová alebo rekonštituovaná voda alebo odchlórovaná voda z vodovodu	s čistým povrchom, studňová alebo rekonštituovaná voda alebo odchlórovaná voda z vodovodu
20. Obdobie pred expozíciou	odporúča sa 7 dní	odporúča sa 7 dní	odporúča sa 7 dní
21. Trvanie expozície chemikálii	21 dní	21 dní	21 dní
22. Biologické parametre	prežitie správanie sekundárne pohlavné znaky vitelogenín	prežitie správanie sekundárne pohlavné znaky vitelogenín	prežitie správanie vitelogenín
23. Prijateľnosť testu	rozpustený kyslík > 60 % saturácie; stredná teplota 25 °C ± 2 °C; prežitie rýb v kontrolných vzorkách 90 %; merané testovacie koncentrácie v rozsahu 20 % strednej meranej hodnoty pre každú úroveň aplikácie chemikálie	rozpustený kyslík > 60 % saturácie; stredná teplota 24 °C ± 2 °C; prežitie rýb v kontrolných vzorkách 90 %; merané testovacie koncentrácie v rozsahu 20 % strednej meranej hodnoty pre každú úroveň aplikácie chemikálie	rozpustený kyslík > 60 % saturácie; stredná teplota 26 °C ± 2 °C; prežitie rýb v kontrolných vzorkách 90 %; merané testovacie koncentrácie v rozsahu 20 % stredných meraných hodnôt pre každú úroveň aplikácie chemikálie

▼**M6**

Dodatok 3

Niektoré chemické vlastnosti prijateľnej riediacej vody

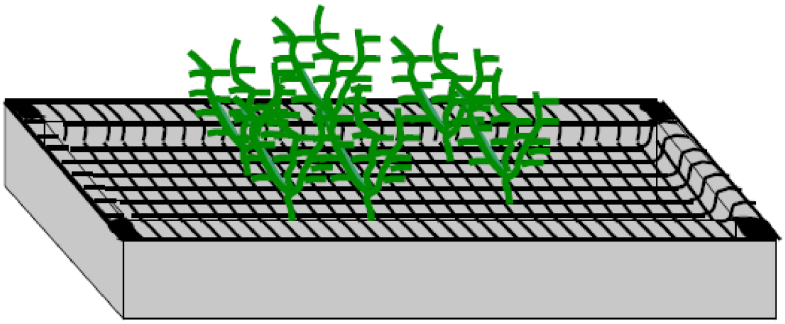
Zložka	Koncentrácie
Tuhé častice	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Zostatkový chlór	< 10 µg/l
Celkové organofosfátové pesticídy	< 50 ng/l
Celkové organochlórované pesticídy a polychlórované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlór	< 25 ng/l

▼M6

Dodatok 4A

Substrát na neresenie pre dánio pruhované

Nádoba na neresenie: celosklená nádoba s rozmermi napríklad 22 × 15 × 5,5 cm (dĺžka × šírka × výška) pokrytá odnímateľnou drôtenou mriežkou z nehrdzavejúcej ocele (so šírkou otvorov 2 mm). Mriežka by mala pokrývať otvor nádoby v rovine položenej nižšie, ako je okraj nádoby.



Na mriežku by sa mal upevniť substrát na neresenie. Rybám by mal poskytovať štruktúru, do ktorej môžu preniknúť. Vhodné sú napríklad umelé akváriové rastliny vyrobené zo zeleného plastového materiálu (poznámka: je potrebné zobrať do úvahy možnú adsorpciu testovanej chemikálie na plastový materiál). Plastový materiál by sa mal dostatočne dlho lúhovať v dostatočnom objeme teplej vody, aby sa zabezpečilo, že do vody použitej na testovanie sa neprenesú žiadne chemikálie. V prípade použitia sklených materiálov by sa malo zabezpečiť, aby sa ryby pri intenzívnom pohybe nezranili ani neochromili.

Vzdialenosť medzi nádobou a sklenými stenami by mala byť najmenej 3 cm, aby sa zabezpečilo, že neresenie sa nevykonáva mimo nádoby. Vajíčka vzniknuté neresením v nádobe prepadávajú cez mriežku a môžu byť odobraté ako vzorky 45 – 60 minút po začiatku osvetlenia. Priesvitné vajíčka sú nepriľnavé a ľahko sa počítajú pomocou transverzálneho svetla. Pri použití piatich samičiek na nádobu sa denný počet vajíčok do 20 môže považovať za nízky, od 20 do 100 za stredný a nad 100 za vysoký. Nádoba na neresenie by sa mala vybrať, vajíčka zozbierať a nádobu na neresenie vložiť späť do testovacej nádoby, buď čo najneskôr večer, alebo veľmi skoro ráno. Čas, ktorý uplynie do opätovného vloženia, by nemal presiahnuť jednu hodinu, lebo inak stopa substrátu na neresenie môže vyvolať individuálne párenie a neresenie v nezvyčajnom čase. Ak si situácia vyžaduje neskoršie vloženie nádoby na neresenie, malo by sa to urobiť najmenej 9 hodín po začiatku osvetlenia. V tomto pokročilom dennom čase sa už neresenie nevyvoláva.

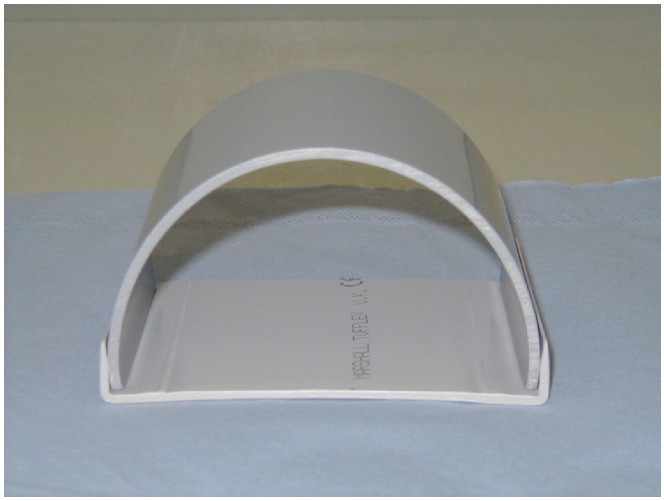
▼**M6**

Dodatok 4B

Substrát na neresenie pre čerebľu potočnú

Do každej skúšobnej komory sa umiestnia dva alebo tri kombinované plastové/keramické/sklené alebo nerezové oblúkové kryty s podložkami na neresenie (napr. 80 mm dlhý sivý polkruhový žľab uložený na podložke so zvýšeným okrajom a s dĺžkou 130 mm) (pozri obrázok). Riadne vyzreté kryty z PVC alebo keramiky sa ukázali ako vhodné miesto pre substrát na neresenie (Thorpe *et al*, 2007).

Odporúča sa kryty obrúsiť, aby sa zvýšila ich adhézia. Podložka by mala byť prekrytá sieťkou tak, aby sa zabránilo rybám v prístupe k padajúcim vajíčkam, pokiaľ nebola preukázaná účinná priľnavosť k substrátu na neresenie.



Dno je konštruované tak, aby obsahovalo všetky vajíčka, ktoré nepriľnú k povrchu krytu a spadnú na dno nádoby (alebo vajíčka, ktoré sa uložia priamo na plochú plastovú spodnú časť). Všetky substráty na neresenie by sa mali pred použitím minimálne 12 hodín lúhovať v riediacej vode.

LITERATÚRA

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

Dodatok 5A

Posúdenie sekundárnych pohlavných znakov čereble potočnej na zistenie určitých chemikálií s účinkom na endokrinný systém

Prehľad

Medzi potenciálne dôležité znaky fyzického vzhľadu dospelých jedincov čereble potočnej pri testovaní endokrinných disruptorov patrí farba tela (t. j. svetlá/tmavá), vzorované sfarbenie (t. j. prítomnosť alebo neprítomnosť zvislých pruhov), tvar tela (t. j. tvar hlavovej a prsnej oblasti, brušná distenzia) a špecializované sekundárne pohlavné znaky (t. j. počet a veľkosť tuberkulov, veľkosť záhlavnej časti chrbta a kladielka).

Tuberkuly sa nachádzajú na hlave (záhlavná časť chrbta) reprodukčne aktívnych samčekov čereble potočnej a ich usporiadanie je obvykle dvojstranne symetrické (Jensen *et al.*, 2001). Kontrolné vzorky samičiek a mladých samčekov a samičiek nevykazujú vznik žiadnych tuberkulov (Jensen *et al.*, 2001). Až osem jednotlivých tuberkulov sa môže nachádzať okolo očí a medzi nozdrami samčekov. Najväčší počet tuberkulov s najväčšou veľkosťou je umiestnený v dvoch rovnobežných líniách bezprostredne pod nozdrami a nad ústami. prípade mnohých rýb sa skupiny tuberkulov vyskytujú pod dolnou čeľusťou, pričom najbližšie k ústam sa spravidla vyskytujú v pároch, zatiaľ čo bližšie k brušnej časti vznikajú ako skupiny až štyroch tuberkulov. Celkový počet tuberkulov je zriedkavo vyšší ako 30 (rozsah 18 – 28; Jensen *et al.* 2001). Prevládajú (z hľadiska počtu) tuberkuly, ktoré tvoria samostatnú, relatívne okrúhlu štruktúru s výškou približne rovnou polomeru. Väčšina reprodukčne aktívnych samčekov má tiež prinajmenšom niekoľko tuberkulov, ktoré sú zväčšené a výrazné natoľko, že sú nerozoznateľné ako jednotlivé štruktúry.

Niektoré druhy chemikálií narušujúcich endokrinný systém môžu vyvolávať abnormálny výskyt určitých sekundárnych pohlavných znakov pri živočíchoch opačného pohlavia. Napríklad agonisty androgénových receptorov, ako sú 17β-metyltestosterón alebo 17β-trenbolón, môžu spôsobovať vyvinutie tuberkulov pri samičkách čereble potočnej (Smith, 1974; Ankley *et al.* 2001; 2003), zatiaľ čo agonisty estrogénových receptorov môžu znížiť počet alebo veľkosť tuberkulov pri samčekoch (Miles – Richardson *et al.*, 1999; Harries *et al.* 2000).

V ďalšej časti sa uvádza opis charakteristiky tuberkulov čereble potočnej na základe postupov používaných Agentúrou na ochranu životného prostredia Spojených štátov amerických v meste Duluth v štáte Minnesota. Špecifické produkty a/alebo zariadenia sa môžu nahradiť porovnateľnými materiálmi, ktoré sú k dispozícii.

Prehliadanie sa najlepšie vykonáva pomocou osvetlenej lupy alebo trikrát osvetleného stereoskopického mikroskopu. Ryba sa prehliada zo strany chrbta, natočená prednou časťou dopredu (hlavou k prehliadačovi).

a) Ryba sa uloží do malej Petriho misky (napr. s priemerom 100 mm), prednou časť dopredu a brušnou nadol. Hľadáčik sa zameria tak, aby bola možná identifikácia tuberkulov. Ryba sa jemne a pomaly otáča zo strany na stranu a identifikujú sa oblasti tuberkulov. Tuberkuly sa spočítajú a zaznamenajú.

b) Ryba sa v Petriho miske uloží chrbtovou časťou nadol, prednou dopredu, a vykoná sa prehliadka povrchu brušnej časti hlavy.

c) Pozorovania každej ryby by sa mali ukončiť do dvoch minút.

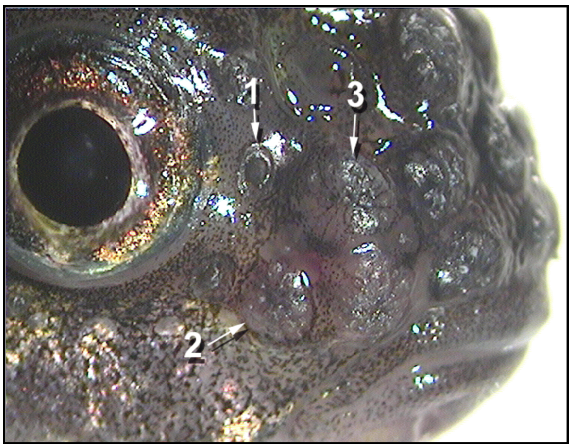
▼M6

Počítanie a klasifikácia tuberkulov

Určených bolo šesť osobitných oblastí hodnotenia prítomnosti a vývoja tuberkulov pri dospelých jedincoch čereble potočnej. Vypracoval sa vzor, ako mapovať umiestnenie a množstvo prítomných tuberkulov (pozri koniec tohto dodatku). Počet tuberkulov sa zaznamenáva a ich veľkosť môže byť pre každý organizmus kvantitatívne klasifikovaná ako: 0 – neprítomný, 1 – prítomný, 2 – zväčšený a 3 – výrazný (obrázok 1).

Kategória 0 – neprítomný nijaký tuberkul. Kategória 1 – prítomný, identifikovaný akýkoľvek jednotlivý tuberkul, ktorého výška sa približne rovná jeho polomeru (priemeru).Kategória 2 – zväčšený, identifikovaný na základe tkaniva, ktoré vzhľadom pripomína hviezdičku, zvyčajne s veľkou radiálnou základňou s dráždkami alebo so žliabkami vychádzajúcimi zo stredu. Vrchná časť tuberkula je často viac vrúbkovaná, ale niekedy môže byť čiastočne zaoblená. Kategória 3 – výrazný, zvyčajne pomerne veľký a zaoblený, s menej rozlíšenou štruktúrou. Tieto tuberkuly niekedy spoločne vytvárajú jednotnú masu v jednej oblasti alebo v kombinácii oblastí (B, C a D, ako je opísané v ďalšej časti). Sfarbenie a tvar sú podobné ako v rámci klasifikácie 2, ale niekedy sú dosť málo rozlíšiteľné. Použitie tohto systému klasifikácie vo všeobecnosti povedie k celkovej hodnote < 50 pri bežnom samčekovi z kontrolnej vzorky, s počtom tuberkulov 18 – 20 (Jensen *et al.*, 2001).

Obrázok 1



Skutočný počet tuberkulov na tele niektorých rýb môže byť väčší ako počet políčok v šablóne (dodatok A) pre určitú klasifikovanú oblasť. V takom prípade je možné vyznačiť ďalšie čísla klasifikácie vpravo alebo vľavo od príslušného políčka. Zobrazenie šablóny preto nemusí byť symetrické. Ďalšou technikou mapovania tuberkulov, ktoré sú spojené v pároch alebo vertikálne pozdĺž horizontálnej roviny úst, by mohlo byť dvojité značenie dvoch bodov klasifikácie tuberkulov v jednom políčku.

Mapovacie oblasti:

A – tuberkuly nachádzajúce sa okolo očí. Mapujú sa od chrbtovej časti po brušnú časť okolo predného okraja očí. Na telách zrelých samčekov v kontrolných vzorkách ich je spravidla väčší počet, na telách samičiek v kontrolných vzorkách nie sú prítomné, na telách samičiek vystavených pôsobeniu androgénov sa vo všeobecnosti nachádzajú dva (jeden pri každom oku) alebo jeden osamotený.

B – tuberkuly nachádzajúce sa medzi nozdrami (otvormi zmyslových kanálov). Na telách zrelých samčekov v kontrolných vzorkách sa spravidla vyskytujú v pároch, na vyšších úrovniach vývoja (2 – zväčšené alebo 3 – výrazné). Na telách samičiek v kontrolných vzorkách nie sú prítomné, pričom určitý výskyt a vývoj sa zaznamenal na telách samičiek vystavených pôsobeniu androgénov.

C – tuberkuly nachádzajúce sa bezprostredne pred nozdrami, rovnobežne s ústami. Na telách zrelých samčekov v kontrolných vzorkách sú vo všeobecnosti zväčšené alebo výrazné. Na telách menej vyvinutých samčekov alebo samičiek vystavených pôsobeniu androgénov sú prítomné alebo zväčšené.

▼**M6**

D – tuberkuly nachádzajúce sa rovnobežne pozdĺž línie úst. Na telách zrelých samčekov v kontrolných vzorkách sa vyvíjajú všeobecne podľa klasifikácie. Na telách samičiek v kontrolných vzorkách nie sú prítomné, ale na telách samičiek vystavených pôsobeniu androgénov sú prítomné.

E – tuberkuly nachádzajúce sa na dolnej čeľusti, v blízkosti úst, zvyčajne malé a spravidla v pároch. Výskyt je rôzny v prípade samčekov v kontrolných vzorkách alebo vo vzorkách s aplikovanou chemikáliou a v prípade samičiek vo vzorkách s aplikovanou chemikáliou.

F – tuberkuly nachádzajúce sa v brušnej časti priľahlej k oblasti E. Spravidla sú malé a vyskytujú sa v pároch. Prítomné sú na telách samčekov v kontrolných vzorkách a na telách samičiek vystavených pôsobeniu androgénov.

ODKAZY

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.

Šablóna pre tuberkuly

Identifikácia _____

Dátum _____

Celková hodnota _____

Číselná klasifikácia

1 – prítomný

2 – zväčšený

3 – výrazný

	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

Dodatok 5B

Posúdenie sekundárnych pohlavných znakov medaky pri zisťovaní určitých chemikálií s účinkom na endokrinný systém

Nasleduje opis merania papilárnych procesov (*), ktoré sú sekundárnymi pohlavnými znakmi medaky (*Oryzias latipes*).

(*) Papilárne procesy sa spravidla vyskytujú len pri dospelých samčekoch a nachádzajú sa na lúčoch análnej plutvy od druhého po siedmy alebo ôsmy, počítajúc od zadného konca plutvy (obrázok 1 a 2). Procesy sa však len zriedka vyskytujú na prvom lúči od zadného konca análnej plutvy. Tento štandardný operačný postup sa vzťahuje na meranie výrastkov na prvom lúči plutvy (poradové čísla lúčov análnej plutvy sa v rámci tohto štandardného operačného postupu počítajú od zadného konca análnej plutvy).

1. Po vyrezaní pečene (dodatok 6) sa mŕtve telo vloží do kužeľovej banky, ktorá obsahuje približne 10 ml 10 % neutrálneho tlmeného formalínu (smerom hore: hlava, smerom dolu: chvost). Ak sa gonáda fixuje inak než v 10 % neutrálnym tlmeným formalínom, je potrebné mŕtve telo rozrezať priečnym rezom medzi prednou časťou análnej plutvy a análnym otvorom pomocou žiletky, pričom treba dbať, aby sa nenarušil gonopór ani samotná gonáda (obrázok 3). Kraniálna strana tela ryby sa vloží do fixačného roztoku na konzervovanie gonád a chvostová strana tela ryby do 10 % neutrálneho tlmeného formalínu, ako už bolo opísané.

2. Po vložení tela ryby do 10 % neutrálneho tlmeného formalínu sa uchopí predná časť análnej plutvy pomocou pinzety a ohne sa približne na 30 sekúnd, aby sa plutva roztiahla. Pri uchopení análnej plutvy pomocou pinzety uchopte opatrne niekoľko lúčov plutvy v prednej časti, aby sa nepoškodili papilárne procesy.

3. Po roztiahnutí análnej plutvy približne na 30 sekúnd sa telo ryby uloží do 10 % neutrálneho tlmeného formalínu pri izbovej teplote, až do začiatku merania papilárnych procesov (meranie by sa malo vykonať po fixovaní v dĺžke najmenej 24 hodín).

Meranie

1. Po fixovaní tela ryby v 10 % neutrálnom tlmenom formalíne najmenej 24 hodín sa mŕtve telo ryby vyberie z kužeľovej banky a formalín sa otrie filtračným papierom (alebo papierovou utierkou).

2. Ryba sa položí brušnou stranou nahor. Potom sa pomocou malých pitevných nožníc opatrne odreže análna plutva (odporúča sa odrezať análnu plutvu aj s malou časťou opornej kosti pterygiophore).

3. Oddelená análna plutva sa pinzetou uchopí za prednú časť a položí sa na podložné sklíčko s niekoľkými kvapkami vody. Potom sa plutva zakryje krycím sklíčkom. Pri uchopení análnej plutvy pomocou pinzety je potrebné dávať pozor, aby sa nepoškodili papilárne procesy.

4. Pomocou počítadla pod biologickým mikroskopom (stojanovým alebo inverzným) sa určí počet spojených platničiek s papilárnymi procesmi. Papilárne procesy sa vykazujú, keď je na zadnom okraji spojenej platničky viditeľné malé zoskupenie výrastkov. Do pracovného hárku sa zapíše počet

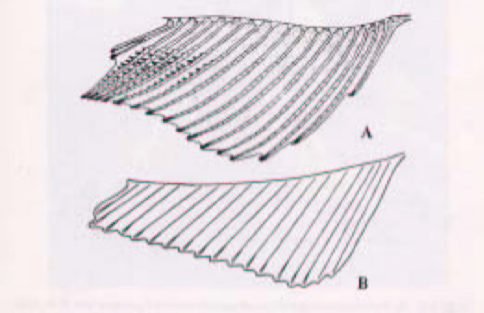
▼M6

spojených platničiek s papilárnymi procesmi na každom lúči plutvy (napr. prvý lúč plutvy: 0, druhý lúč plutvy: 10, tretí lúč plutvy: 12 atď.) a v tabuľke programu Excel sa uvedie súčet týchto počtov pre jednotlivé ryby. V prípade potreby sa urobí fotografia análnej plutvy a počet spojených platničiek s papilárnymi procesmi sa určí z tejto fotografie.

5. Po meraní sa análna plutva vloží do kužeľovej banky opísanej v bode 1 a odloží sa.

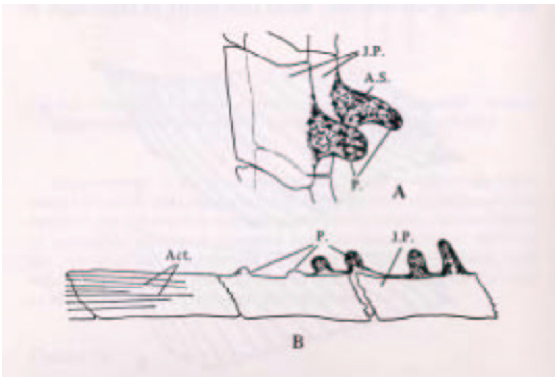
Obr. 1.

Obrázok znázorňujúci rozdiely medzi pohlaviami, pokiaľ ide o tvar a veľkosť análnej plutvy. A: samček, B:samička. 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.



Obr. 2.

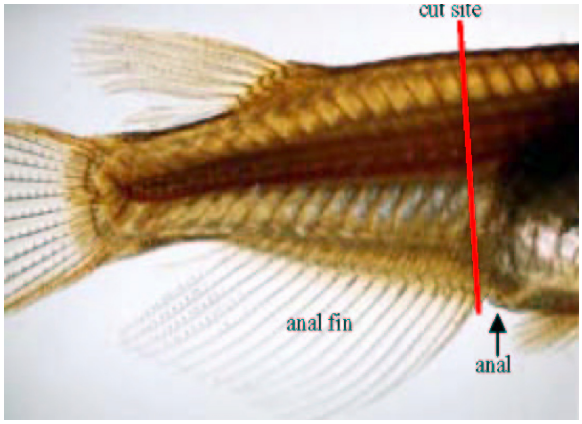
A, Procesy na spojených platničkách lúča análnej plutvy. J.P.: spojená platnička, A.S.: axiálny priestor, P.: proces B, Distálny koniec lúča plutvy. Na úplnom konci sú lúče plutvy actinotrichia (Act.). Oka, T. B., 1931: On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209 – 218.



▼M6

Obr. 3.

Fotografia tela ryby, ktorá znázorňuje miesto rezu v prípade, že sa gonáda fixuje v inom fixačnom roztoku, než je 10 % neutrálny tlmený formalín. V takom prípade sa telo rozreže medzi prednou časťou análnej plutvy a análnym otvorom pomocou žiletky (červená čiara), hlavová strana tela ryby sa vloží do fixačného roztoku na konzervovanie gonád a chvostová strana tela ryby sa vloží do 10 % neutrálneho tlmeného formalínu.



▼M6

Dodatok 6

Odporúčané postupy odberu vzoriek na analýzu vitelogenínu

Je potrebné dbať na to, aby sa zabránilo krížovej kontaminácii medzi vzorkami vitelogenínu samčekov a samičiek.

Postup 1A: Čerebľa potočná, odber krvi z chvostovej žily/tepny

Po anestetizovaní sa čepeľou skalpela nareže chvostový pedunkulus a pomocou heparinizovanej mikrohematokritovej kapilárnej kanyly sa odoberie krv z chvostovej tepny/žily. Po odobratí krvi sa rýchlo izoluje plazma odstreďovaním počas troch minút pri 15 000 *g* (alebo alternatívne počas desiatich minút pri 15 000 g a teplote 4 ° C). Ak sa to vyžaduje, po odstreďovaní je možné stanoviť percentuálnu hodnotu hematokritu. Časť plazmy sa odoberie z mikrohematokritovej kanyly, vloží sa do odstreďovacej skúmavky spolu s 0,13 jednotky aprotinínu (inhibítor proteázy) a uchová sa pri teplote – 80 ° C, pokým nebude možné stanoviť vitelogenín. V závislosti od veľkosti čereble potočnej (závisí od pohlavia) sa objem plazmy, ktorú je možné odobrať, vo všeobecnosti pohybuje v rozmedzí 5 – 60 µl na jednu rybu (Jensen *et al.*, 2001).

Postup 1B: Čerebľa potočná, odber krvi zo srdca

Alternatívne sa krv môže odobrať srdcovou punkciou pomocou heparinizovanej striekačky (1 000 jednotiek heparínu na ml). Krv sa preloží do Eppendorfových skúmaviek (uložených na ľade) a potom sa odstredí (5 minút, 7 000 g, izbová teplota). Plazma by sa mala presunúť do čistých Eppendorfových skúmaviek (v alikvotných množstvách, ak to objem plazmy umožňuje) a rýchlo zmraziť na – 80 °C, pokým sa nevykoná analýza (Panter *et al.*, 1998).

Postup 2A: Medaka japonská, vyrezanie pečene

Vybratie testovacej ryby zo skúšobnej komory

1. Testovacia ryba by sa mala vybrať zo skúšobnej komory pomocou malého podberáka. Je potrebné dávať pozor, aby testovacia ryba nespadla do inej skúšobnej komory.

2. Testovacie ryby by sa mali v zásade vyberať v tomto poradí: kontrolná vzorka, kontrolná vzorka s rozpúšťadlom (ak je to vhodné), najnižšia koncentrácia, stredná koncentrácia, najvyššia koncentrácia a pozitívna kontrolná vzorka. Okrem toho by sa mali z každej skúšobnej komory najskôr vybrať všetci samčekovia, až potom zostávajúce samičky.

3. Pohlavie každej testovacej ryby sa určí na základe vonkajších sekundárnych pohlavných znakov (napr. tvaru análnej plutvy).

4. Testovacia ryba sa vloží do prepravného kontajnera a premiestni na pracovisko určené na vyrezanie pečene. Je potrebné skontrolovať správnosť údajov na štítkoch na skúšobnej komore a prepravnom kontajneri, aby sa potvrdilo, že počet rýb, ktoré sa vybrali zo skúšobnej komory, a počet rýb, ktoré v skúšobnej komore zostali, je v súlade s očakávaním.

5. Ak nie je možné určiť pohlavie rýb na základe ich vonkajšieho vzhľadu, vyberú sa všetky ryby zo skúšobnej komory. V tom prípade by sa pohlavie malo určiť na základe pozorovania gonád alebo sekundárnych pohlavných znakov stereoskopickým mikroskopom.

▼**M6**

Vyrezanie pečene

1. Testovacia ryba sa preloží z prepravného kontajnera do anestetického roztoku pomocou malého podberáka.

2. Po anestetizovaní sa testovacia ryba pomocou pinzety (spotrebného druhu) uloží na filtračný papier (alebo na papierovú utierku). Rybu je potrebné uchopiť pinzetou za boky hlavy, aby sa zabránilo zlomeniu chvosta.

3. Voda z povrchu testovacej ryby sa utrie filtračným papierom (alebo papierovou utierkou).

4. Ryba sa položí brušnou stranou nahor. Potom sa pomocou pitevných nožníc urobí malý priečny zárez medzi časťou brucha v blízkosti hlavy a strednou časťou brucha.

5. Pitevné nožnice sa vložia do malého rezu a brucho sa rozstrihne pozdĺž stredovej línie od zadného bodu žiabrového krytu po kraniálnu stranu análneho otvoru. Je potrebné dávať pozor, aby sa pitevné nožnice nevložili príliš hlboko a nedošlo k poškodeniu pečene a gonád.

6. Ďalšie operácie je potrebné vykonať pomocou stereoskopického mikroskopu.

7. Testovacia ryba sa položí brušnou stranou nahor na papierovú utierku (použiť sa môže aj sklená Petriho miska alebo podložné sklíčko).

8. Pomocou presnej pinzety sa rozšíria steny brušnej dutiny a vyberú sa z nej vnútorné orgány. Je tiež prípustné, aby sa v prípade potreby vnútorné orgány vybrali odstránením jednej bočnej steny brušnej dutiny.

9. Pomocou ďalšej presnej pinzety sa odhalí spojená časť pečene a žlčníka. Potom sa uchopí žlčovod a žlčník sa odreže. Je potrebné dávať pozor, aby sa žlčník nepoškodil.

10. Uchopí sa pažerák a rovnakým spôsobom sa od pečene oddelí tráviaci trakt. Je potrebné dávať pozor, aby nedošlo k úniku obsahu tráviaceho traktu. Kaudálny tráviaci trakt sa oddelí od análneho otvoru a odstráni z brušnej dutiny.

11. Z okrajových častí pečene sa odreže tuková hmota a iné tkanivá. Je potrebné dávať pozor, aby sa pečeň nepoškodila.

12. Pečeň sa uchopí presnou pinzetou za oblasť brány a vyberie sa z brušnej dutiny.

13. Pečeň sa uloží na podložné sklíčko. V prípade potreby sa pomocou presnej pinzety odstráni z povrchu pečene akýkoľvek ďalší tuk a cudzie tkanivo (napr. výstelka brucha).

14. Hmotnosť pečene sa meria pomocou elektronických analytických váh s mikroskúmavkou 1,5 ml predstavujúcou hmotnosť obalu. Hodnota sa zaznamená do pracovného hárku (napr.: 0,1 mg). Je potrebné potvrdiť identifikačné údaje na štítku mikroskúmavky.

15. Mikroskúmavka obsahujúca pečeň sa uzavrie a uloží do chladiaceho boxu (alebo mraziaceho boxu).

16. Po vyrezaní jednej pečene je potrebné pitevné nástroje vyčistiť, alebo ich nahradiť čistými.

▼M6

17. Pečeň sa odoberie z tiel všetkých rýb v prepravnom kontajneri, ako už bolo uvedené.

18. Po vyrezaní pečene z tiel všetkých rýb v prepravnom kontajneri (t. j. všetkých samčekov alebo samičiek v skúšobnej komore) sa všetky vzorky pečene uložia v skúmavkách do stojana s identifikačnými štítkami a vložia sa do mraziaceho boxu. Ak sa pečeň krátko po vyrezaní venuje na predúpravu, vzorky sa na nasledujúce pracovisko prenášajú v chladiacom boxe (alebo mraziacom boxe).

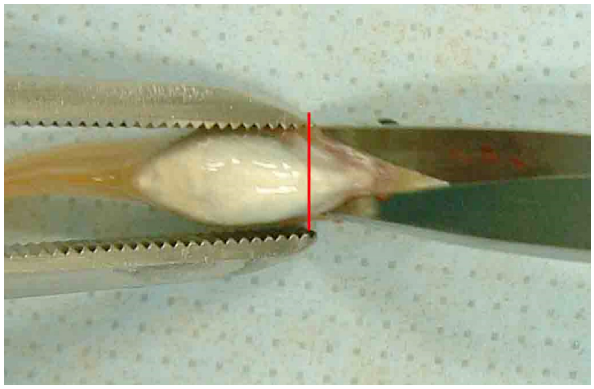
Po vyrezaní pečene je mŕtve telo ryby k dispozícii na meranie sekundárnych pohlavných znakov.

Vzorka

Ak sa vzorky pečene nepoužijú na predúpravu krátko po vyrezaní z tela testovacej ryby, musia sa skladovať pri teplote ≤ – 70 °C.

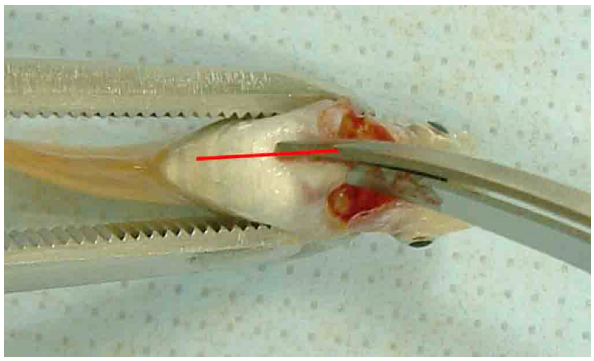
Obrázok 1

Nožnicami sa urobí rez tesne pred prsnými plutvami.



Obrázok 2

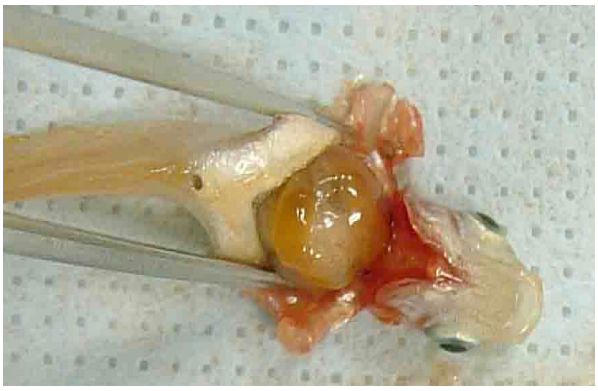
Stredová línia brucha sa nožnicami rozstrihne k bodu približne 2 mm od kraniálnej strany análneho otvoru.



▼M6

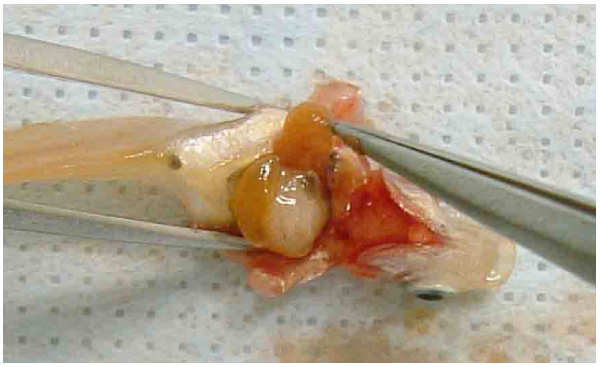
Obrázok 3

Pomocou pinzety sa rozšíria steny brušnej dutiny a odhalí sa pečeň a ďalšie vnútorné orgány. (Alternatívne sa steny brušnej dutiny môžu zboku pripevniť).



Obrázok 4

Pečeň sa vyberie a vyreže priamo pomocou pinziet.



Obrázok 5

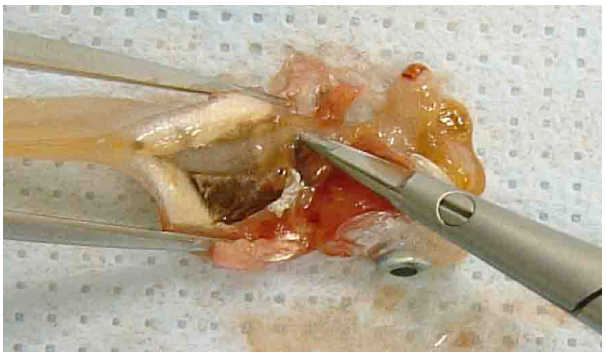
Črevá sa jemne odtiahnu pomocou pinzety.



▼M6

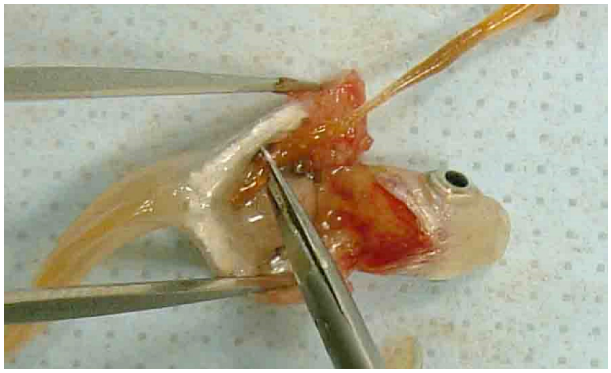
Obrázok 6

Obidva konce čriev a akékoľvek mezenteriálne pripojenia sa oddelia pomocou nožníc.



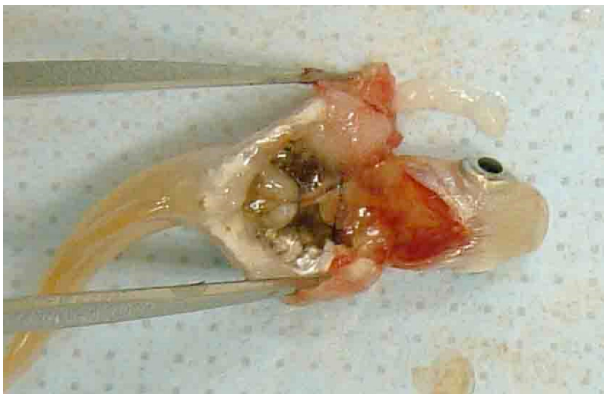
Obrázok 7 (samička)

Postup v prípade samičiek je rovnaký.



Obrázok 8

Postup je ukončený.



Postup 2 B: Medaka japonská (*Oryzias latipes*), predbežná úprava pečene na analýzu vitelogenínu

Zo súpravy ELISA sa vyberie fľaša tlmivého roztoku homogenátu a ochladí sa rozdrveným ľadom (teplota roztoku: ≤ 4 °C). Ak sa použije tlmivý roztok homogenátu zo systému EnBio ELISA, nechá sa rozmraziť pri izbovej teplote a potom sa fľaša ochladí rozdrveným ľadom.

▼**M6**

Vypočíta sa objem tlmivého roztoku homogenátu pre pečeň na základe jej hmotnosti (pre homogenát sa pridá 50 µl tlmivého roztoku homogenátu na 1 mg hmotnosti pečene). Napríklad ak je hmotnosť pečene 4,5 mg, objem tlmivého roztoku homogenátu pre pečeň je 225 µl. Je potrebné vypracovať zoznam objemu tlmivého roztoku homogenátu pre všetky pečene.

Príprava pečene na predúpravu

1. Tesne pred predúpravou sa z mraziaceho boxu vyberie 1,5 ml mikroskúmavka obsahujúca pečeň.

2. Predúprava pečene samčekov by sa mala vykonať pred úpravou pečene samičiek, aby sa zabránilo kontaminácii vitelogenínu. Okrem toho, predúprava pre testovacie skupiny by sa mala vykonať v tomto poradí: kontrolná vzorka, kontrolná vzorka s rozpúšťadlom (ak je to vhodné), najnižšia koncentrácia, stredná koncentrácia, najvyššia koncentrácia a pozitívna kontrolná vzorka.

3. Počet 1,5 ml mikroskúmaviek so vzorkami pečene, ktoré sa v danom čase vyberú z mraziaceho boxu, by nemal prekročiť počet 1,5 ml mikroskúmaviek, ktoré sa môžu v danom čase odstreďovať.

4. 1,5 ml mikroskúmavky so vzorkami pečene sa uložia v poradí podľa čísel vzoriek v mraziacom boxe (nie je potrebné pečeň rozmrazovať).

Postup predúpravy

1. Pridanie homogenizačného tlmivého roztoku

   1. Podľa zoznamu sa zistí objem tlmivého roztoku homogenátu, ktorý sa má použiť pre konkrétnu vzorku pečene, a mikropipeta sa nastaví na príslušný objem (rozsah objemu: 100 – 1 000 µl). Na mikropipetu sa nasadí čistý hrot.

   2. Tlmivý roztok homogenátu sa odoberie z fľaše reaktantu a pridá sa do 1,5 ml mikroskúmavky obsahujúcej pečeň.

   3. Uvedeným postupom sa tlmivý roztok homogenátu pridá do všetkých 1,5 ml mikroskúmaviek obsahujúcich pečeň. Nie je potrebné meniť hrot mikropipety za nový. Ak je však hrot kontaminovaný, alebo by mohol byť kontaminovaný, mal by sa vymeniť.

2. Homogenizácia pečene

   1. Na homogenizátor mikroskúmaviek sa nasadí nové miešadlo na homogenizáciu.

   2. Do 1,5 ml mikroskúmavky sa vloží miešadlo. Homogenizátor sa drží tak, aby bola pečeň pritlačená medzi povrch miešadla a vnútornú stenu mikroskúmavky.

   3. Homogenizátor sa uvedie do prevádzky na 10 – 20 sekúnd. Počas prevádzky je potrebné chladiť mikroskúmavku rozdrveným ľadom.

   4. Miešadlo sa vytiahne z 1,5 ml mikroskúmavky a nechá sa v pokoji približne 10 sekúnd. Potom sa vykoná vizuálna kontrola stavu suspenzie.

   5. Ak sa v suspenzii pozorujú kúsky pečene, je potrebné opakovať operácie 3 a 4, aby sa pripravil uspokojivý homogenát pečene.

▼**M6**

6. Suspendovaný homogenát pečene sa chladí v mraziacom boxe až do odstredenia.

7. Pre každý homogenát je potrebné vymeniť miešadlo za nové.

8. Uvedeným postupom sa zhomogenizujú všetky pečene s tlmivým roztokom homogenátu.

3. Odstreďovanie suspendovaného homogenátu pečene

1. Je potrebné overiť, či je teplota v chladenej komore centrifúgy ≤ 5 °C.

2. Do chladenej centrifúgy sa vložia 1,5 ml mikroskúmavky obsahujúce suspendovaný homogenát pečene (v prípade potreby sa upraví rovnováha).

3. Suspendovaný homogenát pečene sa odstreďuje 10 minút pri 13 000 *g* a teplote ≤ 5 °C. Ak sú však supernatanty dostatočne oddelené, sila a čas odstreďovania sa môžu upraviť podľa potreby.

4. Po odstredení je potrebné skontrolovať, či sú supernatanty primerane oddelené (povrchová vrstva: tuk, stredná vrstva: supernatant, spodná vrstva: tkanivo pečene). Ak oddelenie nie je primerané, suspenzia sa opäť odstredí za tých istých podmienok.

5. Všetky vzorky sa vyberú z chladenej centrifúgy a uložia v poradí podľa čísel vzoriek v mraziacom boxe. Je potrebné dať pozor, aby sa znovu nesuspendovali vrstvy oddelené po odstreďovaní.

4. Odber supernatantu

1. Do stojana na skúmavky sa vložia štyri 0,5 ml mikroskúmavky na uloženie supernatantu.

2. Z každého supernatantu (oddeleného ako stredná vrstva) sa pomocou mikropipety odoberie 30 µl a vloží sa do jednej 0,5 ml mikroskúmavky. Je potrebné dať pozor, aby sa neodobral tuk z povrchovej vrstvy alebo tkanivo pečene zo spodnej vrstvy.

3. Supernatant sa odoberie a rozdelí do dvoch ďalších 0,5 ml mikroskúmaviek rovnakým spôsobom, ako už bolo uvedené.

4. Zvyšok supernatantu sa odoberie pomocou mikropipety (ak je to možné: ≥ 100 µl). Vloží sa do poslednej 0,5 ml mikroskúmavky. Je potrebné dať pozor, aby sa neodobral tuk z povrchovej vrstvy alebo tkanivo pečene zo spodnej vrstvy.

5. 0,5 ml mikroskúmavka sa uzavrie a na štítok sa napíše objem supernatantu. Hneď potom sa mikroskúmavky ochladia v mraziacom boxe.

6. Hrot mikropipety sa vymení za nový pre každý supernatant. Ak sa na hrote usadí veľké množstvo tuku, je potrebné ho ihneď vymeniť, aby sa zabránilo kontaminácii pečeňového extraktu tukom.

7. Všetky odstredené supernatanty sa uvedeným postupom vložia do štyroch 0,5 ml mikroskúmaviek.

▼M6

8. Všetky 0,5 ml mikroskúmavky sa po vložení supernatantu uložia do stojana s identifikačnými štítkami a potom sa okamžite zmrazia v mraziacom boxe. Ak sa koncentrácie vitelogenínu merajú ihneď po predúprave, jedna 0,5 ml mikroskúmavka (obsahujúca 30 µl supernatantu) sa drží v chladenom stojane a potom sa premiestni na pracovisko, kde sa vykonáva test ELISA. V takom prípade sa zostávajúce mikroskúmavky uložia do stojanov a zmrazia v mraziacom boxe.

9. Po odbere supernatantu sa zvyšok primerane zlikviduje.

Uskladnenie vzoriek

0,5 ml mikroskúmavky obsahujúce supernatant homogenátu pečene sa udržiavajú pri teplote ≤ – 70 °C, až kým sa nepoužijú na test ELISA.

Postup 3A: Dánio pruhované, odber krvi z chvostovej žily/tepny

Bezprostredne po anestéze sa priečne nareže chvostový pedunkulus a pomocou heparinizovanej mikrohematokritovej kapilárnej kanyly sa odstráni krv z chvostovej tepny/žily. Objemy krvi sa pohybujú v rozmedzí od 5 do 15 µl v závislosti od veľkosti rýb. Rovnaký objem tlmivého roztoku aprotinínu (6 µgml vo fosfátovom tlmivom fyziologickom roztoku) sa pridá do mikrokapilárnej skúmavky a z krvi sa odstreďovaním oddelí plazma (5 minút pri 600 g). Plazma sa odoberie do testovacích skúmaviek a udržiava sa pri teplote – 20 °C, až kým sa nezačne analyzovať na prítomnosť vitelogenínu alebo iných skúmaných proteínov.

Postup 3B: Dánio pruhované, odber krvi srdcovou punkciou

S cieľom zabrániť zrážaniu krvi a degradácii proteínov sa vzorky odoberajú vo fosfátovom tlmivom fyziologickom roztoku (PBS) obsahujúcom heparín (1 000 jednotiek/ml) a inhibítor proteázy aprotinín (2 TIU/ml). Ako prísady do tlmivého roztoku sa odporúčajú heparín amóniová soľ a lyofilizovaný aprotinín. Na odber vzoriek krvi sa odporúča striekačka (1 ml) s pevnou tenkou ihlou (napr. Braun Omnikan-F). Striekačka by sa mala vopred naplniť tlmivým roztokom (približne 100 µl), aby sa úplne eluovali malé objemy krvi z každej ryby. Vzorky krvi sa odoberajú srdcovou punkciou. Ryba by sa mala najskôr anestetizovať s MS-222 (100 mg/l). Správna hladina anestézie umožňuje používateľovi rozpoznať tlkot srdca dánia pruhovaného. Pri punkcii srdca je potrebné držať piest striekačky pod miernym tlakom. Objem krvi, ktorú je možné odobrať, sa pohybuje v rozsahu 20 – 40 mikrolitrov. Po srdcovej punkcii by sa mala testovacia skúmavka naplniť zmesou krvi a tlmivého roztoku. Plazma sa z krvi oddelí odstreďovaním (20 min, 5 000 g) a mala by sa udržiavať pri teplote – 80 °C, až kým sa nezačne analyzovať.

Postup 3C:Štandardný operačný postup: Dánio pruhované, homogenizácia hlavy a chvosta

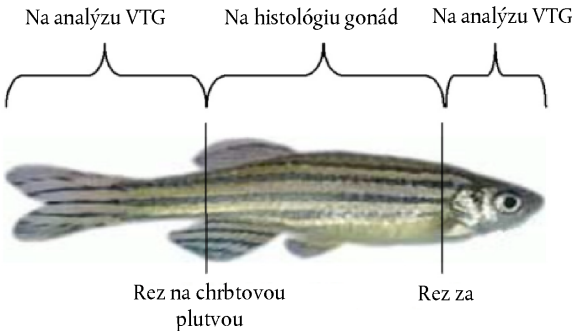
1. Ryba sa anestetizuje a usmrtí v súlade s opisom testu.

2. Hlava a chvost sa odrežú z tela ryby podľa obrázka 1.

Upozornenie: Všetky pitevné nástroje a doska na rezanie by sa mali medzi spracovávaním jednotlivých rýb riadne opláchnuť a vyčistiť (napr. 96 % etanolom), aby sa zabránilo „vitelogenínovému znečisteniu“ neindukovaných samčekov od samičiek alebo indukovaných samčekov.

▼**M6**

Obrázok 1



3. Celková hmotnosť hlavy a chvosta z každej ryby sa meria s presnosťou na miligramy.

4. Po odvážení sa jednotlivé časti vložia do príslušných skúmaviek (napr. 1,5 ml Eppendorfovej) a zmrazia sa pri teplote – 80 °C až do homogenizácie, alebo sa homogenizujú priamo na ľade pomocou dvoch plastových miešadiel. (Môžu sa použiť aj iné metódy, ak sa vykonávajú na ľade a výsledkom je homogénna hmota). Upozornenie: Skúmavky by mali byť riadne očíslované tak, aby bolo možné hlavu a chvost ryby priradiť k časti tela, ktorá sa používa na histológiu gonád.

5. Keď sa dosiahne homogénna hmota, pridá sa ľadový homogenizačný tlmivý roztok (*) predstavujúci štvornásobok hmotnosti tkaniva. Zmes sa ďalej spracováva miešadlami, kým nie je homogénna. Dôležitá poznámka: Pre každú jednotlivú rybu sa používajú nové miešadlá.

6. Vzorky sú uložené na ľade až do začiatku 30-minútového odstreďovania pri teplote 4 °C a 50 000 × g.

7. Na vloženie dávok 20 µl supernatantu do najmenej dvoch skúmaviek sa použije pipeta. Hrot pipety sa prestrčí pod vrstvu tuku na povrchu a opatrne sa odsaje supernatant bez tukových alebo tuhých frakcií.

8. Skúmavky sa pred použitím skladujú pri teplote – 80 °C.

(*) **Homogenizačný tlmivý roztok:**
— [50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % zmes inhibítora proteázy (Sigma)]: 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl zmes inhibítora proteázy.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) napríklad od Bie & Berntsen, Dánsko.
— zmes inhibítora proteázy: od Sigma (pre tkanivá cicavcov), číslo výrobku P 8340.
— *Poznámka:* Homogenizačný tlmivý roztok by sa mal použiť v deň, keď bol pripravený. Počas použitia musí byť uložený na ľade.

▼**M6**

Dodatok 7

Obohatené vzorky vitelogenínu a referenčná látka-štandard

Každý deň, keď sa vykonávajú testy na zistenie vitelogenínu, sa budú analyzovať obohatené vzorky pripravené na základe referenčnej látky-štandard. Vitelogenín použitý na prípravu referenčnej látky-štandard musí pochádzať z inej dávky než vitelogenín použitý na prípravu kalibračných štandardov pre vykonávaný test.

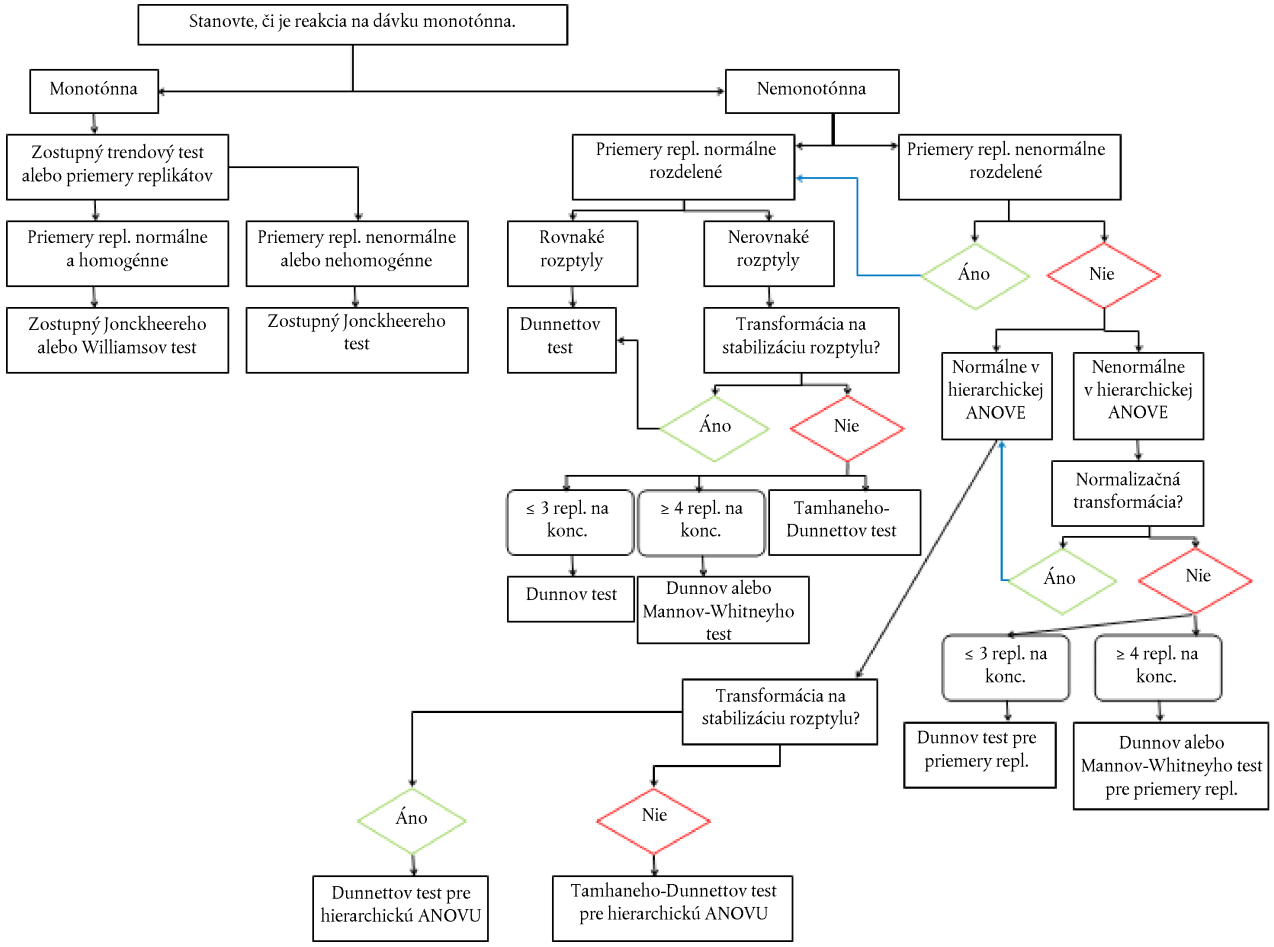
Obohatená vzorka sa pripraví pridaním známeho množstva štandardu do kontrolnej vzorky plazmy samčekov. Vzorka sa obohatí tak, aby sa dosiahla koncentrácia vitelogenínu 10- až 100-násobná oproti očakávanej koncentrácii v kontrolnej vzorke samčekov rýb. Kontrolná vzorka plazmy samčekov, ktorá sa obohatí, môže pochádzať od jednej ryby alebo môže byť zmesou od viacerých rýb.

Čiastková vzorka neobohatenej vzorky plazmy samčekov sa bude analyzovať najmenej v dvoch duplicitných súboroch. Obohatená vzorka sa tiež bude analyzovať najmenej v dvoch duplicitných súboroch. Stredné množstvo vitelogenínu v dvoch neobohatených kontrolných vzorkách plazmy samčekov sa pridá k vypočítanému množstvu vitelogenínu pridanému na obohatenie vzoriek s cieľom stanoviť očakávanú koncentráciu. Spolu s výsledkami z každého súboru testov vykonaných v daný deň sa uvádza pomer tejto očakávanej koncentrácie a nameranej koncentrácie.

▼M6

Dodatok 8

Schéma rozhodovania pre štatistickú analýzu



02008R0440 — SK — 16.10.2019 — 008.001 — 2200

▼M6

C.38. SKÚŠKA METAMORFÓZY OBOJŽIVELNÍKOV

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 231 (2009). Potreba vyvinúť a validovať skúšku schopnú zistiť chemikálie pôsobiace v systéme štítnej žľazy stavovcov vyplýva z obavy, že úrovne chemikálií v životnom prostredí môžu spôsobiť nepriaznivé účinky u ľudí aj voľne žijúcich živočíchov. Organizácia OECD v roku 1998 iniciovala činnosť s vysokou prioritou s cieľom vykonať revíziu existujúcich usmernení a vypracovať nové usmernenia na skríning a testovanie potenciálnych endokrinných disruptorov. Jednou zložkou tejto činnosti bolo vytvoriť usmernenie na skríning chemikálií pôsobiacich na systém štítnej žľazy stavovcov. Navrhlo sa rozšírenie 28-dňovej štúdie orálnej toxicity po opakovanom podaní pri hlodavcoch (kapitola B.7 tejto prílohy) a skúška metamorfózy obojživelníkov (AMA). Rozšírená testovacia metóda B.7 prešla validáciou a bola vydaná revidovaná testovacia metóda. Skúška metamorfózy obojživelníkov (AMA) prešla rozsiahlym programom validácie, ktorého súčasťou boli vnútrolaboratórne a medzilaboratórne štúdie, ktoré preukázali význam a spoľahlivosť skúšky (1, 2). Validácia skúšky bola následne predmetom partnerského preskúmania panelom nezávislých odborníkov (3). Táto testovacia metóda je výsledkom skúseností získaných počas validačných štúdií zameraných na zisťovanie chemikálií pôsobiacich v štítnej žľaze a práce vykonanej v členských krajinách OECD.

PRINCÍP TESTU

2. Skúška metamorfózy obojživelníkov (AMA) je skríningová skúška určená na empirickú identifikáciu chemikálií, ktoré môžu narušať normálnu funkciu osi hypotalamus – hypofýza – štítna žľaza (HPT). AMA predstavuje všeobecný model pre stavovce, lebo je založená na zachovaných štruktúrach a funkciách osi HPT. Je to dôležitá skúška, lebo metamorfóza obojživelníkov predstavuje dobre preskúmaný proces závislý od štítnej žľazy, ktorý reaguje na chemikálie pôsobiace v rámci osi HPT. Ide o jedinú existujúcu skúšku, ktorou sa zisťuje pôsobenie na štítnu žľazu pri živočíchovi prechádzajúcom morfologickým vývinom.

3. Všeobecná koncepcia pokusu zahŕňa expozíciu žubrienok druhu *Xenopus laevis* v štádiu 51 minimálne trom rôznym koncentráciám testovanej chemikálie a kontrolnej riedenej vode počas 21 dní. Každá testovaná koncentrácia sa testuje v štyroch replikátoch. Hustota lariev na začiatku testu je 20 žubrienok na testovaciu nádrž pre všetky skupiny s aplikovanou chemikáliou. Pozorovacie sledované parametre sú dĺžka zadných končatín, dĺžka od pysku po kloaku (SVL), vývinové štádium, mokrá hmotnosť, histológia štítnej žľazy a každodenné pozorovania úmrtnosti.

OPIS METÓDY

Testovací druh

4. *Xenopus laevis* sa bežne kultivuje v laboratóriách na celom svete a je ľahko dostupný prostredníctvom komerčných dodávateľov. Pri tomto druhu sa po celý rok ľahko vyvoláva rozmnožovanie pomocou injekcií ľudského chorionického gonadotropínu (hCG) a výsledné larvy sa rutinne vo veľkom počte chovajú až po vybraté vývinové štádiá, čo umožňuje použitie testovacích protokolov špecifických pre dané štádium. Najvhodnejšie je na skúšku použiť larvy pochádzajúce z interných dospelých

▼M6

jedincov. Alternatívne si laboratórium vykonávajúce test môže objednať vajíčka alebo embryá, ktorým musí umožniť aklimatizáciu, tento postup však nie je najvhodnejší. Použitie dodaných larválnych štádií v teste je neprijateľné.

Vybavenie a spotrebný materiál

5. Na vykonanie tejto skúšky je potrebné toto vybavenie a spotrebný materiál:

a) expozičný systém (pozri opis ďalej);

b) akváriá zo skla alebo nehrdzavejúcej ocele (pozri opis ďalej);

c) chovné nádrže;

d) prístroje na reguláciu teploty [napr. ohrievače alebo chladiče (nastaviteľné na teplotu 22 °C ± 1 °C)];

e) teplomer;

f) binokulárny disekčný mikroskop;

g) digitálna kamera s rozlíšením aspoň 4 megapixle a s funkciou mikro;

h) softvér na digitalizáciu obrazu;

i) Petriho miska (napr. 100 × 15 mm) alebo priehľadná plastová komora porovnateľnej veľkosti;

j) analytické váhy schopné merať na tri desatinné miesta (mg);

k) prístroj na meranie rozpusteného kyslíka;

l) pH-meter;

m) prístroj na meranie intenzity svetla schopný merať v luxoch;

n) rôzne laboratórne sklo a nástroje;

o) nastaviteľné pipety (10 – 5 000 µl) alebo rôzne pipety zodpovedajúcich veľkostí;

p) testovaná chemikália v dostatočnom množstve na vykonanie štúdie, podľa možnosti z jednej šarže;

q) analytické prístroje vhodné pre testovanú chemikáliu alebo zmluvné analytické služby.

Chemická testovateľnosť

6. Skúška AMA je založená na protokole vodnej expozície, podľa ktorého sa testovaná chemikália privádza do testovacích komôr pomocou prietokového systému. Prietoková metóda však znamená obmedzenie druhov chemikálií, ktoré možno testovať, na základe fyzikálno-chemických vlastností chemikálie. Pred použitím tohto protokolu by sa preto mali získať základné informácie o chemikálii potrebné na určenie testovateľnosti a mal by sa prečítať usmerňovací dokument OECD o testovaní vodnej toxicity ťažkých látok a zmesí (4). Medzi vlastnosti, ktoré naznačujú, že chemikáliu môže byť ťažké testovať vo vodných systémoch, patria: vysoká

▼M6

rozdeľovacia konštanta oktanol/voda (log Kow), vysoká prchavosť, náchylnosť na hydrolýzu a náchylnosť na fotolýzu v laboratórnych podmienkach osvetlenia. Z hľadiska určenia testovateľnosti môžu mať význam aj iné faktory, ktoré by sa mali stanoviť pre každý jednotlivý prípad. Ak nie je možné úspešne otestovať danú chemikáliu pomocou prietokového testovacieho systému, možno použiť statický obnovovací systém. Ak ani jeden z týchto systémov nie je vhodný pre testovanú chemikáliu, štandardným postupom je netestovať ju pomocou tohto protokolu.

Expozičný systém

7. Podľa možnosti sa uprednostňuje prietokový zrieďovací systém pred statickým obnovovacím systémom. Ak fyzikálne a/alebo chemické vlastnosti niektorej z testovaných chemikálií nevyhovujú použitiu prietokového zrieďovacieho systému, možno použiť alternatívny expozičný (napr. statický obnovovací) systém. Komponenty systému, ktoré prichádzajú do kontaktu s vodou, by mali byť zo skla, nehrdzavejúcej ocele a/alebo polytetrafluóretylénu. Možno však použiť aj vhodné plasty, ak to nenaruší štúdiu. Expozičné nádrže by mali byť akváriá zo skla alebo nehrdzavejúcej ocele vybavené zvislými trubicami s približným objemom nádrže 4,0 – 10,0 l a minimálnou hĺbkou vody 10 – 15 cm. Systém by mal byť schopný podporovať všetky expozičné koncentrácie a kontrolu, a to v štyroch replikátoch na testovanú koncentráciu. Prietok v každej nádrži má byť konštantný, aby sa zachovali stabilné biologické podmienky a expozícia chemikálii (napr. 25 ml/min.). Testovacie nádrže by sa mali náhodne prideliť na určitú pozíciu v expozičnom systéme, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy pozície vrátane miernych odchýlok v teplote, intenzite svetla atď. Malo by sa použiť žiarivkové osvetlenie na zabezpečenie fotoperiódy 12 hodín svetla: 12 hodín tmy pri intenzite v rozsahu 600 – 2 000 luxov (lumen/m^2) na povrchu vody. Voda by sa mala udržiavať pri teplote 22 °C ± 1 °C, pH medzi 6,5 – 8,5 a koncentrácia rozpusteného kyslíka > 3,5 mg/l (> 40 % rozpustnosť vzdušného kyslíka) v každej testovacej nádrži. Keďže minimálna teplota vody, pH a rozpustený kyslík by sa mali merať raz za týždeň, ideálne by sa aspoň v jednej testovacej nádobe mala teplota merať nepretržite. V dodatku 1 sa uvádzajú podmienky pokusu, za ktorých by sa protokol mal vykonať. Ďalšie informácie o inštalácii prietokových expozičných systémov a/alebo statických obnovovacích systémov sa nachádzajú v štandardnom usmernení ASTM na vykonávanie testov akútnej toxicity na testovaných materiáloch pre ryby, makrobezstavovce a obojživelníky (5) a vo všeobecných vodných toxikologických testoch.

Kvalita vody

8. Možno použiť akúkoľvek na mieste dostupnú vodu (napr. pramenistú vodu alebo vodu z vodovodu filtrovanú pomocou drevného uhlia), ktorá umožňuje normálny rast a vývin žubrienok *X. laevis*. Keďže kvalita miestnej vody sa môže medzi jednotlivými oblasťami výrazne líšiť, mala by sa vykonať analýza kvality vody, najmä ak nie sú dostupné historické údaje o použiteľnosti vody na chov rodu *Xenopus*. Osobitná pozornosť by sa mala venovať tomu, aby voda neobsahovala meď, chlór a chloramíny, ktoré sú toxické pre žaby a žubrienky. Ďalej sa odporúča vykonať analýzu vody z hľadiska hodnoty pozadia pre fluorid, perchlorát a chlorát (vedľajší produkt dezinfekcie pitnej vody), pretože všetky tieto anióny sú

▼M6

substráty jódového transportéra štítnej žľazy a ich zvýšená hladina môže narušiť výsledok štúdie. Analýza by sa mala vykonať pred začatím testovania a testovacia voda by za normálnych okolností nemala obsahovať tieto anióny.

Koncentrácia jodidu v testovacej vode

9. Na to, aby štítna žľaza mohla tvoriť hormón štítnej žľazy, larvy musia mať k dispozícii dostatok jodidu z kombinácie vodných a potravných zdrojov. V súčasnosti neexistujú empiricky odvodené usmernenia pre minimálne koncentrácie jodidu. Dostupnosť jodidu však môže ovplyvniť schopnosť systému štítnej žľazy reagovať na látky pôsobiace v štítnej žľaze a je známe, že jodid reguluje základnú činnosť štítnej žľazy, čo je aspekt, ktorý si zaslúži pozornosť pri interpretácii výsledkov histopatologického vyšetrenia štítnej žľazy. Preto je nutné v správe uviesť namerané koncentrácie jodidu v testovacej vode. Na základe dostupných údajov z validačných štúdií protokol preukázateľne dobre funguje pri koncentrácii jodidu (I^-) v testovacej vode medzi 0,5 a 10 µg/l. V ideálnom prípade by minimálna koncentrácia jodidu v testovacej vode mala byť 0,5 µg/l. Ak sa testovacia voda rekonštituuje z deionizovanej vody, mal by sa pridať jód na dosiahnutie minimálnej koncentrácie 0,5 µg/l. Každé ďalšie pridanie jódu alebo iných solí do testovacej vody by sa malo zaznamenať do správy.

Chov živočíchov

Párenie dospelých jedincov a starostlivosť o ne

10. Párenie dospelých jedincov a starostlivosť o ne sa vykonávajú v súlade so štandardnými usmerneniami. Podrobnejšie informácie sa nachádzajú v štandardných usmerneniach na vykonanie skúšky teratogenézy žabích embryí (FETAX) (6). Tieto štandardné usmernenia sú príkladom vhodných metód starostlivosti a párenia, ale nevyžaduje sa ich prísne dodržiavanie. Na vyvolanie párenia sa párom (3 – 5) dospelých samičiek a samčekov vstrekne ľudský chorionický gonadotropín (hCG). Samičkám sa vstrekne približne 800 – 1 000 IU a samčekom približne 600 – 800 IU hCG rozpusteného v 0,6 – 0,9 % fyziologickom roztoku. Páriace sa páry sa držia vo veľkých nádržiach nerušené a za statických podmienok, aby sa podporil amplexus. Na spodku každej rozmnožovacej nádrže by malo byť falošné dno vytvorené zo siete z nehrdzavejúcej ocele alebo plastu, ktoré umožňuje padanie vajíčkových más na spodok nádrže. Žaby, ktoré dostali injekciu neskoro popoludní, zvyčajne nakladú väčšinu vajíčok v polovici dopoludnia nasledujúceho dňa. Po uvoľnení a oplodnení dostatočného množstva vajíčok je potrebné vybrať dospelých jedincov z rozmnožovacích nádrží.

Starostlivosť o larvy a ich výber

11. Po vybratí dospelých jedincov z rozmnožovacích nádrží sa vajíčka pozbierajú a vyhodnotia z hľadiska životaschopnosti pomocou reprezentatívnej podvzorky embryí zo všetkých rozmnožovacích nádrží. Najlepšie jednotlivé znášky (odporúčajú sa dve až tri na vyhodnotenie kvality znášok) na základe životaschopnosti embryí a prítomnosti dostatočného počtu (najmenej 1 500) embryí sa zachovajú. Všetky organizmy použité v štúdii by mali pochádzať z jednej znášky (t. j. znášky by sa nemali miešať dohromady). Embryá sa prenesú na veľkú plochú podložku alebo misku a všetky zjavne mŕtve alebo abnormálne vajíčka [pozri vymedzenie v literatúre (5)] sa odstránia pomocou pipety alebo očného kvapkadla. Kvalitné embryá z každej z troch znášok sa prenesú do troch samostatných nádrží na liahnutie. Štyri dni po umiestnení do nádrží na liahnutie sa na základe životaschopnosti a úspešného vyliahnutia vyberie najlepšia znáška a larvy

▼M6

sa prenesú do primeraného počtu chovných nádrží s teplotou 22 °C ± 1 °C. Okrem toho sa niekoľko ďalších lariev prenesie do iných nádrží na použitie ako náhrady v prípade, že v chovných nádržiach dôjde počas prvého týždňa k úmrtnosti. Týmto postupom sa zachová stabilná hustota organizmov, čím sa znížia rozdiely vo vývine v kohorte z jednej znášky. Všetky chovné nádrže sa musia každý deň dočista vysať. Ako preventívne opatrenie sa namiesto latexových rukavíc odporúča použiť vinylové alebo nitrilové rukavice. Uhynuté larvy sa odstraňujú každý deň a následne sa dopĺňajú náhradné larvy, aby sa počas prvého týždňa zachovala hustota organizmov. Kŕmenie by sa malo vykonávať aspoň dvakrát denne.

12. Počas predexpozičnej fázy sa žubrienky aklimatizujú na podmienky expozičnej fázy vrátane druhu potravy, teploty, cyklu svetla a tmy a kultivačného média. Preto sa odporúča použiť v predexpozičnej i expozičnej fáze rovnakú kultivačnú/riediacu vodu. Ak sa na chov žubrienok v predexpozičnej fáze používa statický kultivačný systém, kultivačné médium by sa malo vymieňať kompletne aspoň dvakrát týždenne. Je potrebné vyhnúť sa nadmernej hustote žubrienok spôsobenej vysokou hustotou lariev v období pred expozíciou, pretože môže zásadne ovplyvniť vývin žubrienok počas nasledujúcej testovacej fázy. Hustota počas chovu by preto nemala presiahnuť približne štyri žubrienky/l kultivačného média (statický expozičný systém) alebo desať žubrienok/l kultivačného média (s prietokom v predexpozičnom alebo kultivačnom systéme napr. 50 ml/min.). Za týchto podmienok by sa žubrienky mali vyvinúť zo štádií 45/46 do štádia 51 do 12 dní. Reprezentatívne žubrienky z tejto zásobnej populácie by sa mali každý deň kontrolovať z hľadiska vývinového štádia s cieľom odhadnúť vhodný časový bod na začatie expozície. Pozornosť by sa mala venovať minimalizovaniu stresu a traumy žubrienok, a to najmä počas presunov, čistenia akvárií a manipulácie s larvami. Je potrebné vyhýbať sa stresujúcim podmienkam/činnostiam, ako je silný a/alebo nepretržitý hluk, búchanie na akváriá, vibrácie v akváriách, nadmerná činnosť v laboratóriu a náhle zmeny okolitého prostredia (dostupnosti svetla, teploty, pH, rozpusteného kyslíka, prietoku vody atď.). Ak vývin žubrienok nepokročí do štádia 51 do 17 dní od oplodnenia, za potenciálnu príčinu možno považovať nadmerný stres.

Kultivácia a kŕmenie lariev

13. Žubrienky sa počas celého obdobia pred expozíciou [po Nieuwkoopovej a Faberovej (NF) fáze 45/46 (8)] a počas celého testovacieho obdobia 21 dní kŕmia napríklad komerčným krmivom pre žubrienky používaným vo validačných štúdiách (pozri tiež dodatok 1) alebo inou potravou, použitím ktorej sa preukazne dosahujú rovnaké výsledky v skúške metamorfózy obojživelníkov. Kŕmny režim počas obdobia pred expozíciou sa musí starostlivo upraviť tak, aby zodpovedal požiadavkám vyvíjajúcich sa žubrienok. To znamená, že čerstvo vyliahnutým žubrienkam by sa niekoľkokrát denne (aspoň dvakrát) mali podávať malé dávky potravy. Nemá sa podávať nadmerné množstvo potravy, aby sa *i)* zachovala kvalita vody a *ii)* zabránilo upchatiu žiabrových filtrov časticami a zvyškami potravy. V prípade krmiva pre žubrienky použitého vo validačných štúdiách by sa denný prídel potravy mal zvyšovať spolu s rastom žubrienky na približne 30 mg/živočích/deň krátko pred začatím testu. Vo validačných štúdiách sa preukázalo, že toto komerčne dostupné krmivo podporuje správny rast a vývin žubrienok *X. laevis*. Skladá sa z jemných

▼M6

častíc, ktoré zostanú dlho suspendované vo vodnom stĺpci a odstraňujú sa prúdom vody. Preto by sa celkové denné množstvo potravy malo rozdeliť na menšie dávky a podávať aspoň dvakrát denne. Kŕmny režim pre toto krmivo je uvedený v tabuľke 1. Dávky krmiva by sa mali zaznamenávať. Môže sa podávať suché alebo ako zásobný roztok pripravený v riediacej vode. Tento zásobný roztok sa má čerstvo pripravovať každý druhý deň a, keď sa nepoužíva, má sa skladovať pri teplote 4 C.

Tabuľka 1

Kŕmny režim pre komerčne dostupné krmivo pre žubrienky použité vo validačných štúdiách so žubrienkami *X. laevis* počas časti skúšky AMA so živými živočíchmi v podmienkach prietoku

Deň štúdie	Prídel potravy (mg krmiva/živočích/deň)
0. – 4.	30
5. – 7.	40
8. – 10.	50
11. – 14.	70
15. – 21.	80

Analytická chémia

14. Pred vykonaním štúdie by sa mala vyhodnotiť stabilita testovanej chemikálie s využitím dostupných informácií o jej rozpustnosti, degradovateľnosti a prchavosti. Z testovacích roztokov zo všetkých nádrží s replikátom pre každú koncentráciu by sa mali odobrať vzorky na analytické chemické analýzy na začiatku testu (0. deň) a každý týždeň počas testu, spolu minimálne štyri vzorky. Takisto sa odporúča, aby sa každá testovaná koncentrácia analyzovala aj počas prípravy systému pred začiatkom testu na overenie výkonnosti systému. Okrem toho sa odporúča, aby sa analyzovali aj zásobné roztoky, keď sa menia, najmä ak objem zásobného roztoku neposkytuje dostatočné množstvo chemikálie na analýzy počas celého bežného obdobia odberu vzoriek. V prípade chemikálií, ktoré nemožno zistiť pri niektorých alebo všetkých koncentráciách použitých v teste, by sa mali odmerať zásobné roztoky a mali by sa zaznamenať prietoky systému, aby bolo možné vypočítať nominálne koncentrácie.

Aplikovanie chemikálie

15. Metódy používané na aplikovanie testovanej chemikálie do systému sa môžu líšiť v závislosti od jej fyzikálno-chemických vlastností. Chemikálie rozpustné vo vode možno rozpustiť v alikvotných častiach testovacej vody v koncentrácii, ktorá umožňuje aplikovanie pri cieľovej testovanej koncentrácii v prietokovom systéme. Chemikálie, ktoré sú kvapalné pri izbovej teplote a slabo rozpustné vo vode, možno aplikovať pomocou metód saturátora kvapalina: kvapalina. Chemikálie, ktoré sú pevné pri izbovej teplote a slabo rozpustné vo vode, možno aplikovať pomocou saturačných kolón so sklenou vatou (7). Odporúča sa použiť testovací systém bez nosiča. Rôzne testované chemikálie však budú mať odlišné fyzikálno-chemické vlastnosti, ktoré si pravdepodobne budú vyžadovať rôzne prístupy k príprave vody na expozíciu chemikálii. Odporúča sa urobiť všetko pre to, aby nebolo nutné použiť rozpúšťadlá alebo nosiče, pretože: *i)* niektoré rozpúšťadlá samotné môžu mať za následok toxicitu a/alebo nežiaduce

▼M6

alebo neočakávané endokrinologické odozvy, *ii)* testované chemikálie vo vyššom množstve ako ich rozpustnosť vo vode (k čomu často dochádza pri použití rozpúšťadiel) môžu viesť k nepresnému stanoveniu účinných koncentrácií a *iii)* použitie rozpúšťadiel v dlhodobých testoch môže mať za následok tvorbu značného „biofilmu“ spojeného s mikrobiálnou aktivitou. V prípade ťažko testovateľných chemikálií možno rozpúšťadlo použiť ako poslednú možnosť, pričom na stanovenie najlepšej metódy je potrebné prečítať si usmerňovací dokument OECD o testovaní vodnej toxicity ťažkých látok a zmesí (4). Výber rozpúšťadla sa stanoví na základe chemických vlastností chemikálie. Medzi rozpúšťadlá, ktoré sa považujú za účinné na testovanie vodnej toxicity, patrí acetón, etanol, metanol, dimetylformamid a trietylénglykol. V prípade použitia rozpúšťadla ako nosiča by koncentrácie rozpúšťadla mali byť nižšie ako chronická koncentrácia, pri ktorej sa nepozorujú účinky (NOEC). V usmerňovacom dokumente OECD sa odporúča maximálne 100 µl/l, pričom v nedávnom preskúmaní sa odporúča použiť koncentráciu rozpúšťadla len 20 µl/l riediacej vody (12). Ak sa používajú rozpúšťadlá ako nosiče, okrem kontrolných skupín bez rozpúšťadla by sa mali vyhodnotiť aj vhodné kontrolné skupiny s rozpúšťadlom (čistá voda). Ak nie je možné aplikovať chemikáliu prostredníctvom vody z dôvodu fyzikálno-chemických vlastností (nízkej rozpustnosti) alebo obmedzenej chemickej dostupnosti, možno uvažovať o jej aplikovaní v potrave. Uskutočnil sa predbežný výskum expozície v prípade aplikovania v potrave, ale tento spôsob expozície sa bežne nepoužíva. Výber metódy by sa mal zdokumentovať a analyticky overiť.

Výber testovaných koncentrácií

Stanovenie vysokej testovanej koncentrácie

16. Na účely tohto testu sa vysoká testovaná koncentrácia má stanoviť podľa limitu rozpustnosti testovanej chemikálie, maximálnej tolerovanej koncentrácie (MTC) pre akútne toxické chemikálie alebo na 100 mg/l, podľa toho, ktorá hodnota je najnižšia.

17. MTC sa vymedzuje ako najvyššia testovaná koncentrácia chemikálie, ktorá vedie k menšej ako 10 % akútnej úmrtnosti. Tento prístup predpokladá, že existujú empirické údaje o akútnej úmrtnosti, na základe ktorých možno odhadnúť MTC. Odhad MTC môže byť nepresný a zvyčajne si vyžaduje určitý odborný posudok. Hoci používanie regresných modelov môže byť z technického hľadiska najvhodnejším prístupom k odhadu MTC, užitočnú aproximáciu MTC možno odvodiť aj z existujúcich údajov o akútnej toxicite ako 1/3 hodnoty akútnej LC_{50}. Údaje o akútnej toxicite testovacieho druhu však nemusia byť k dispozícii. Ak údaje o akútnej toxicite konkrétneho druhu nie sú k dispozícii, možno uskutočniť 96-hodinový test LC_{50} so žubrienkami, ktoré sú reprezentatívne (t. j. v rovnakom štádiu) pre žubrienky testované v skúške AMA. Prípadne ak sú k dispozícii údaje o iných vodných druhoch (napr. štúdie LC_{50} pri rybách alebo iných druhoch obojživelníkov), možno na základe odborného posudku odhadnúť pravdepodobnú hodnotu MTC pomocou medzidruhovej extrapolácie.

18. Alternatívne ak chemikália nie je akútne toxická a je rozpustná pri koncentrácii nad 100 mg/l, potom sa za najvyššiu testovanú koncentráciu (HTC) má považovať 100 mg/l, pretože táto koncentrácia sa zvyčajne považuje za „prakticky netoxickú“.

▼M6

19. Hoci statické obnovovacie metódy nie sú odporúčaným postupom, môžu sa použiť, keď prietokové metódy nie sú dostatočné na dosiahnutie MTC. Ak sa použijú statické obnovovacie metódy, je potrebné zdokumentovať stabilitu koncentrácie testovanej chemikálie, ktorá by mala zostať v rámci hraníc kritérií účinnosti. Odporúčajú sa 24-hodinové obdobia obnovovania. Obdobia obnovovania dlhšie ako 72 hodín nie sú prijateľné. Okrem toho sa na konci každého obdobia obnovovania bezprostredne pred obnovením majú odmerať parametre kvality vody (napr. rozpustný kyslík, teplota, pH atď.).

Rozsah testovanej koncentrácie

20. Požadované *minimum* predstavujú tri testované koncentrácie a kontrolná skupina s čistou vodou (a kontrolná skupina, ktorej bolo aplikované vehikulum, ak to je potrebné). Minimálny rozdiel medzi najvyššou a najnižšou testovanou koncentráciou by mal byť približne jedna rádová hodnota. Maximálny rozstup medzi dávkami je 0,1 a minimálny 0,33.

POSTUP

Začiatok a vykonanie testu

0. deň

21. Expozícia by sa mala začať vtedy, keď dostatočný počet žubrienok z predexpozičnej zásobnej populácie dosiahne vývinové štádium 51 podľa Nieuwkoopa a Fabera (8), pričom musia mať vek 17 dní alebo menej od oplodnenia. Na účely výberu testovacích živočíchov sa zdravé a normálne vyzerajúce žubrienky zo zásobnej populácie majú spoločne vložiť do jednej nádoby s vhodným objemom riediacej vody. Na stanovenie vývinového štádia sa žubrienky majú po jednej vyberať zo spoločnej nádrže pomocou malej siete alebo cedidla a preniesť do priehľadnej meracej komory (napr. 100 mm Petriho misky) s riediacou vodou. Pri stanovovaní štádia nie je vhodné použiť anestéziu, individuálne však možno žubrienky pred manipuláciou uspať s použitím 100 mg/l trikaín metánsulfonátu (napr. MS-222) vhodne tlmeného hydrogénuhličitanom sodným (pH 7,0). Ak sa použije, metodika správneho použitia napr. MS-222 na anestéziu sa má získať od skúsených laboratórií a uviesť v správe spolu s výsledkami testu. So živočíchmi sa počas tohto prenosu musí manipulovať opatrne, aby sa minimalizoval stres pri manipulácii a aby nedošlo k poraneniu.

22. Vývinové štádium živočíchov sa stanovuje pomocou binokulárneho disekčného mikroskopu. V záujme zníženia základnej variability vo vývinovom štádiu je dôležité, aby sa toto stanovenie vykonalo čo najpresnejšie. Podľa Nieuwkoopa a Fabera (8) je hlavným vývinovým znakom pri výbere organizmov v štádiu 51 morfológia zadných končatín. Morfologické vlastnosti zadných končatín by sa mali preskúmať pod mikroskopom. Kým na získanie komplexných informácií o stanovovaní štádií žubrienok je nutné prečítať si celé usmernenie od Nieuwkoopa a Fabera (8), vývinové štádium možno spoľahlivo určiť aj pomocou nápadných morfologických znakov. Nasledujúcu tabuľku možno použiť na zjednodušenie a štandardizovanie procesu stanovovania štádia v priebehu štúdie prostredníctvom identifikovania nápadných morfologických znakov spojených s rôznymi štádiami za predpokladu, že vývin je normálny.

▼**M6**

Tabuľka 2

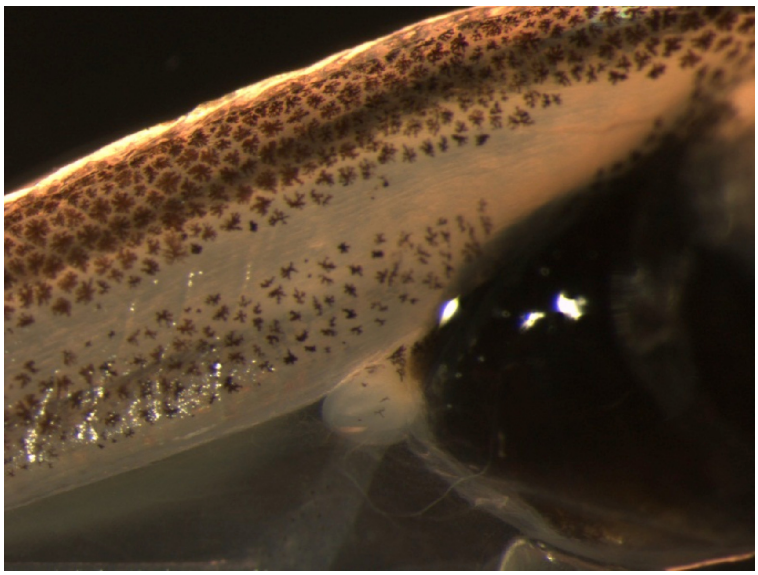
Nápadné morfologické znaky jednotlivých štádií podľa usmernenia Nieuwkoopa a Fabera

Nápadné morfologické znaky	Vývinové štádium															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Zadné končatiny	X	X	X	X	X	X	X									
Predné končatiny						X	X	X	X	X						
Kraniofaciálna štruktúra										X	X	X	X			
Morfológia čuchového nervu											X	X	X			
Dĺžka chvosta													X	X	X	X

23. Na to, aby bolo možné začať test, musia byť všetky žubrienky v štádiu 51. Najnápadnejší morfologický znak tohto štádia je morfológia zadných končatín, čo potvrdzuje obrázok 1.

Obrázok 1

Morfológia zadných končatín žubrienky *X. laevis* v štádiu 51



24. Okrem výberu pokusných živočíchov podľa vývinového štádia možno voliteľne použiť aj výber podľa veľkosti. Na tieto účely je potrebné odmerať dĺžku celého tela (nie SVL) v 0. deň na podvzorke približne 20 žubrienok v štádiu 51 podľa NF. Po výpočte priemernej dĺžky celého tela tejto skupiny živočíchov možno stanoviť minimálne a maximálne hranice pre dĺžku celého tela pokusných živočíchov s rozsahom priemernej hodnoty ± 3 mm (priemeru hodnôt dĺžky celého tela je v rozsahu 24,0 – 28,1 mm pre žubrienky v štádiu 51). Primárnym parametrom na stanovenie pripravenosti každého testovaného živočícha je však stanovenie vývinového štádia. Žubrienky s výrazne viditeľnými malformáciami alebo poraneniami by sa mali zo skúšky vylúčiť.

▼M6

25. Žubrienky, ktoré spĺňajú uvedené kritériá štádia, sa držia v nádrži s čistou kultivačnou vodou až do skončenia procesu stanovovania štádia. Po stanovení štádia sa larvy náhodne rozdelia do expozičných testovacích nádrží tak, aby každá nádrž obsahovala 20 lariev. Živočíchy v každej testovacej nádrži sa potom skontrolujú, či nemajú abnormálny vzhľad (napr. poranenia abnormálne plávanie atď.). Zjavne nezdravo vyzerajúce žubrienky sa majú z testovacích nádrží odstrániť a nahradiť novými larvami zo spoločnej nádrže.

Pozorovania

26. Podrobnejšie informácie o postupoch ukončenia testu a spracovaní žubrienok sa nachádzajú v usmerňovacom dokumente OECD o histológii štítnej žľazy obojživelníkov (9).

Merania v 7. deň

27. V 7. deň sa z každej testovacej nádrže vyberie päť náhodne vybratých žubrienok na replikát. Musí sa použiť taký náhodný postup, aby mal každý testovaný organizmus rovnakú pravdepodobnosť, že bude vybratý. To možno dosiahnuť použitím akejkoľvek randomizačnej metódy, ale vyžaduje sa, aby sa každá žubrienka vybrala sieťkou. Žubrienky, ktoré neboli vybraté, sa vrátia do pôvodnej nádrže a vybraté žubrienky sa humánnym spôsobom usmrtia v 150 – 200 mg/l príslušnej látky, napr. MS-222, primerane tlmenej hydrogénuhličitanom sodným na pH 7,0. Usmrtené žubrienky sa opláchnu vodou a osušia. Následne sa odmeria ich telesná hmotnosť s presnosťou na miligram. Každej žubrienke sa odmeria dĺžka zadných končatín, dĺžka od pysku po kloaku a stanoví sa vývinové štádium (pomocou binokulárneho disekčného mikroskopu).

Merania v 21. deň (ukončenie testu)

28. V deň ukončenia testu (21. deň) sa zostávajúce žubrienky vyberú z testovacích nádrží a humánne usmrtia v 150 – 200 mg/l príslušnej látky, napr. MS-222, primerane tlmenej hydrogénuhličitanom sodným, ako je opísané vyššie. Žubrienky sa opláchnu vodou a osušia. Následne sa odmeria ich telesná hmotnosť s presnosťou na miligram. Pre každú žubrienku sa stanoví vývinové štádium a odmeria SVL a dĺžka zadných končatín.

29. Všetky larvy sa na 48 – 72 hodín umiestnia do Davidsonovho fixačného prostriedku buď ako vzorky celého tela alebo ako narezané vzorky tkaniva hlavy obsahujúce dolnú čeľusť na účely histologických vyšetrení. Na účely histopatologického vyšetrenia sa z každej nádrže s replikátom odoberie vzorka piatich žubrienok. Keďže výška folikulárnych buniek závisí od štádia (10), najvhodnejším prístupom k odberu vzoriek na histologické analýzy je použitie jedincov v rovnakom štádiu, pokiaľ to je možné. Na účely výberu jedincov v rovnakom štádiu sa má pred výberom a následným spracovaním na účely získania údajov a zakonzervovania stanoviť štádium všetkých lariev. To je potrebné preto, lebo normálne rozdiely vo vývine budú viesť k rozdielnej distribúcii štádií v jednotlivých nádržiach s replikátom.

30. Živočíchy vybraté na histopatologické vyšetrenie (n = 5 z každého replikátu) by mali zodpovedať mediánovému štádiu kontrolných živočíchov (spojených replikátov), pokiaľ to je možné. Ak je v niektorých nádržiach s replikátom viac ako päť lariev vo vhodnom štádiu, náhodne sa vyberie päť lariev.

▼M6

31. Ak je v niektorých nádržiach s replikátom menej ako päť lariev vo vhodnom štádiu, náhodne sa vyberú jedince z nasledujúceho nižšieho alebo vyššieho vývinového štádia tak, aby sa dosiahla celková veľkosť vzorky päť lariev na replikát. Rozhodnutie o použití doplnkových lariev z nasledujúceho nižšieho alebo vyššieho vývinového štádia by podľa možnosti malo byť založené na celkovom vyhodnotení distribúcie štádií v kontrolnej skupine a skupinách s aplikovanou chemikáliou. To znamená, že ak je aplikovanie chemikálie spojené s oneskorením vývinu, doplnkové larvy by sa mali odobrať z nasledujúceho nižšieho štádia. Naopak ak je aplikovanie chemikálie spojené s urýchlením vývinu, doplnkové larvy by sa mali odobrať z nasledujúceho vyššieho štádia.

32. V prípade závažných zmien vo vývine žubrienok v dôsledku aplikovania testovanej chemikálie sa môže stať, že distribúcia štádií v skupine s aplikovanou chemikáliou sa nebude prekrývať s vypočítaným mediánovým vývinovým štádiom v kontrolnej skupine. Len v týchto prípadoch sa má výberový proces upraviť tak, že sa použije štádium odlišné od mediánového štádia v kontrolnej skupine, aby bolo možné vykonať histopatologické vyšetrenie štítnej žľazy s použitím vzoriek v rovnakom štádiu. Okrem toho ak štádiá nemožno určiť (t. j. asynchrónia), na histologickú analýzu sa náhodne vyberie päť žubrienok z každého replikátu. Vždy je nutné uviesť odôvodnenie výberu vzoriek lariev, ktoré nie sú v štádiu zodpovedajúcom mediánovému vývinovému štádiu kontrolnej skupiny.

Stanovenie biologických sledovaných parametrov

33. Počas 21-dňovej expozičnej fázy sa meranie základných sledovaných parametrov vykonáva v 7. a 21. deň, testované živočíchy sa však musia pozorovať každý deň. Tabuľka 3 obsahuje prehľad sledovaných parametrov merania a príslušné časové body pozorovania. Podrobnejšie informácie o technických postupoch merania vrcholových sledovaných parametrov a histologických hodnotení sa nachádzajú v usmerňovacích dokumentoch OECD (9).

Tabuľka 3

Časové body pozorovania pre základné sledované parametre skúšky AMA

Vrcholové sledované parametre	denne	7. deň	21. deň
— úmrtnosť	•		
— vývinové štádium		•	•
— dĺžka zadných končatín		•	•
— dĺžka od pysku po kloaku		•	•
— mokrá telesná hmotnosť		•	•
— histológia štítnej žľazy			•

▼M6

Vrcholové sledované parametre

34. Vrcholové sledované parametre skúšky AMA sú vývinové štádium, dĺžka zadných končatín, SVL a mokrá hmotnosť. Každý z nich je stručne opísaný ďalej. Ďalšie technické informácie o zbere týchto údajov vrátane odporúčaných postupov počítačovej analýzy sú k dispozícii v uvedených usmerňovacích dokumentoch.

Vývinové štádium

35. Vývinové štádium žubrienok *X. laevis* sa stanovuje pomocou kritérií stanovenia štádia podľa Nieuwkoopa a Fabera (8). Údaje o vývinovom štádiu slúžia na určenie toho, či je vývin urýchlený asynchrónny, oneskorený alebo nedotknutý. Urýchlenie alebo oneskorenie vývinu sa určuje porovnaním mediánového štádia dosiahnutého v kontrolnej a testovanej skupine. Asynchrónny vývin sa uvádza vtedy, keď skúmané tkanivá nie sú malformované ani abnormálne, ale keď je pri konkrétnej žubrienke narušené relatívne načasovanie morfogenézy alebo vývinu rôznych tkanív.

Dĺžka zadných končatín

36. Diferenciáciu a rast zadných končatín, ktoré sú hlavnými vývinovými znakmi už použitými na stanovenie vývinového štádia, regulujú hormóny štítnej žľazy. Vývin zadných končatín sa používa kvalitatívne na stanovenie vývinového štádia, ale tu sa považuje za kvantitatívny sledovaný parameter. Dĺžka zadných končatín sa preto meria ako sledovaný parameter na zistenie účinkov na os štítnej žľazy (obrázok 2). V záujme jednotnosti sa dĺžka zadných končatín meria na ľavej zadnej končatine. Dĺžka zadných končatín sa vyhodnotí v 7. deň aj 21. deň testu. V 7. deň je meranie dĺžky zadnej končatiny jednoduché ako to vidieť na obrázku 2. V 21. deň je to už zložitejšie z dôvodu ohybov končatiny. Merania dĺžky zadných končatín v 21. deň by preto mali začínať od steny tela a sledovať stredovú čiaru končatiny cez prípadné uhlové odchýlky. Zmeny v dĺžke zadných končatín v 7. deň aj keď nie sú zrejmé v 21. deň, sa stále považujú za významné z hľadiska potenciálneho pôsobenia na štítnu žľazu. Merania dĺžky sa získavajú z digitálnych fotografií pomocou softvéru na analýzu obrazu ako sa uvádza v usmerňovacom dokumente OECD o histológii štítnej žľazy obojživelníkov (9).

Dĺžka tela a mokrá hmotnosť

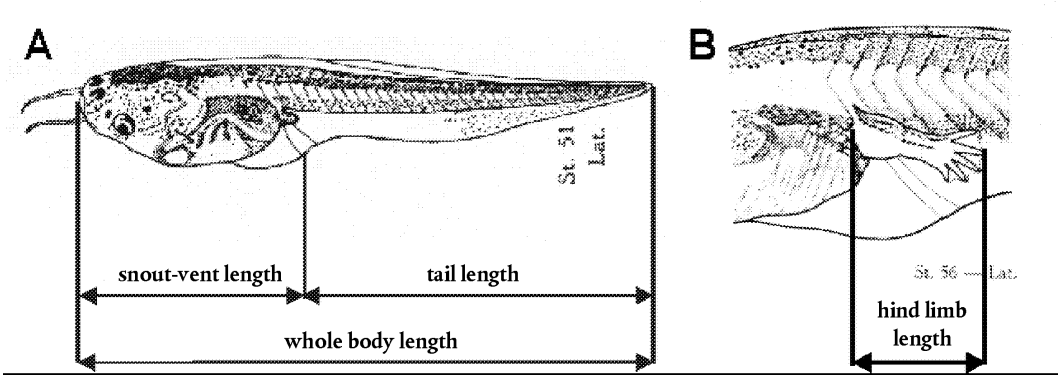
37. Spôsoby stanovenia dĺžky od pysku po kloaku (SVL) (obrázok 2) a mokrej hmotnosti sú uvedené v protokole testu na posúdenie možných účinkov testovaných chemikálií na rýchlosť rastu žubrienok v porovnaní s kontrolnou skupinou a sú užitočné pri detekcii celkovej toxicity na testovanú chemikáliu. Keďže odstránenie priľnutej vody na účely stanovenia hmotnosti môže žubrienke spôsobiť stres a poškodenie kože, tieto merania sa vykonávajú na žubrienkach odobratých ako podvzorky v 7. deň a na všetkých ostatných žubrienkach po ukončení testu (21. deň). V záujme jednotnosti použite kraniálny okraj kloaky ako kaudálny limit merania.

38. Dĺžka od pysku po kloaku (SVL) sa používa na posúdenie rastu žubrienky, ako je znázornené na obrázku 2.

▼M6

Obrázok 2

(A) Druhy meraní dĺžky tela a (B) meranie dĺžky zadných končatín žubrienok *X. laevis* (1).



Histológia štítnej žľazy

39. Zatiaľ čo vývinové štádium a dĺžka zadných končatín sú významné sledované parametre na hodnotenie zmien vo vývoji metamorfózy súvisiacich s expozíciou, oneskorený vývin sa sám osebe nemôže považovať za diagnostický ukazovateľ pôsobenia proti štítnej žľaze. Niektoré zmeny možno zistiť len bežnou histopatologickou analýzou. Diagnostické kritériá zahŕňajú hypertrofiu/atrofiu štítnej žľazy, hypertrofiu folikulárnych buniek, hyperpláziu folikulárnych buniek a ďalšie kvalitatívne kritériá: plochu folikulárnej dutiny, kvalitu koloidu a výšku/tvar folikulárnych buniek. Je potrebné uviesť stupeň závažnosti (štyri stupne). Informácie o získaní a spracovaní vzoriek na histologickú analýzu a o vykonávaní histologickej analýzy vzoriek tkaniva sú k dispozícii v dokumentoch „Skúška metamorfózy obojživelníkov: časť 1 – Technické usmernenia na odber morfologických vzoriek a histologickú prípravu“ a „Skúška metamorfózy obojživelníkov: časť 2 – Prístup k čítaniu štúdií, diagnostických kritérií, stupňov závažnosti a atlasu“ (9). Laboratóriá, ktoré vykonávajú skúšku prvýkrát, by pred uskutočnením histologickej analýzy a vyhodnotením štítnej žľazy mali požiadať o radu skúsených patológov na účely zaškolenia. V prípade zreteľných a podstatných zmien vo vrcholových sledovaných parametroch, ktoré nasvedčujú urýchlenému alebo asynchrónnemu vývinu, nemusí byť nutné vykonať histopatologickú analýzu štítnej žľazy. Ak však zreteľné morfologické zmeny alebo dôkazy o oneskorení vývinu neexistujú, histologické analýzy sú potrebné.

Úmrtnosť

40. Všetky testovacie nádrže sa musia každý deň kontrolovať, či v nich nie sú mŕtve žubrienky. Ak sú, ich počet v každej nádrži sa musí zaznamenať. Pre každý úhyn je potrebné zaznamenať dátum, koncentráciu a číslo nádrže. Mŕtve živočíchy sa musia z nádrže odstrániť ihneď po zistení úhynu. Úmrtnosť presahujúca 10 % môže znamenať nevhodné testovacie podmienky alebo toxické účinky testovanej chemikálie.

Ďalšie pozorovania

41. Je nutné zaznamenať prípady abnormálneho správania a zreteľne viditeľných malformácií a lézií. Pre každé abnormálne správanie, zreteľnú malformáciu alebo léziu je potrebné zaznamenať dátum, koncentráciu a číslo nádrže. Normálne správanie sa vyznačuje rozptýlením žubrienok vo vodnom stĺpci s chvostom vztýčeným nad hlavou, pravidelným rytmickým búchaním chvostovou plutvou, pravidelným vychádzaním na

▼M6

hladinu, vytvorením žiabrových viečok a reagovaním na podnety. Abnormálne správanie zahŕňa napríklad plávanie na povrchu, ležanie na spodku nádrže, obrátené alebo nepravidelné plávanie, nevychádzanie na hladinu a nereagovanie na podnety. Okrem toho je nutné zaznamenať aj výrazné rozdiely v konzumácii potravy medzi vzorkami s aplikovanou chemikáliou. Zreteľné malformácie a lézie môžu okrem iného zahŕňať morfologické abnormality (napr. deformácie končatín), krvavé lézie, bakteriálne alebo plesňové infekcie. Tieto stanovenia sú kvalitatívne a mali by sa považovať za podobné klinickým príznakom ochorenia/stresu a porovnať s kontrolnými živočíchmi. Ak je výskyt alebo miera výskytu v exponovaných nádržiach vyššia ako v kontrolných nádržiach, malo by sa to považovať za dôkaz zjavnej toxicity.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Zber údajov

42. Všetky údaje by sa mali zbierať pomocou elektronických alebo manuálnych systémov, ktoré sú v súlade so správnou laboratórnou praxou (SLP). Údaje zo štúdie by mali zahŕňať:

Testovaná chemikália:

— charakterizácia testovanej chemikálie: fyzikálno-chemické vlastnosti, údaje o stálosti a biodegradovateľnosti,

— chemické informácie a údaje: spôsob a frekvencia prípravy roztokov. Informácie o testovanej chemikálii zahŕňajú skutočné a nominálne koncentrácie testovanej chemikálie a v niektorých prípadoch podľa potreby nepôvodnej chemikálie. Merania testovanej chemikálie sa môžu vyžadovať pre zásobné roztoky i testované roztoky,

— rozpúšťadlo (ak je iné ako voda): odôvodnenie výberu rozpúšťadla a charakterizáciu rozpúšťadla (druh, použitá koncentrácia).

Podmienky testu:

— prevádzkové záznamy: skladajú sa z pozorovaní týkajúcich sa fungovania testovacieho systému a podporného prostredia a infraštruktúry. Typické záznamy zahŕňajú: teplotu okolia, testovaciu teplotu, fotoperiódu, stav kritických prvkov expozičného systému (napr. čerpadiel, počítadiel cyklov, tlakov), prietoky, hladiny vody, zmeny v zásobnej fľaši a záznamy o kŕmení. Všeobecné parametre kvality vody zahŕňajú: pH, rozpustený kyslík, vodivosť, celkový jód, zásaditosť a tvrdosť,

— odchýlky od testovacej metódy: táto informácia by mala zahŕňať všetky informácie o odchýlkach od testovacej metódy alebo ich slovné opisy.

Výsledky:

— biologické pozorovania a údaje: patria sem každodenné pozorovania úmrtnosti, spotreby potravy abnormálneho plávania, letargie, straty rovnováhy, malformácií, lézií atď. Pozorovania a údaje zozbierané vo vopred určených intervaloch zahŕňajú: vývinové štádium, dĺžku zadných končatín, dĺžku od pysku po kloaku a mokrú hmotnosť,

▼M6

— štatistické analytické metódy a odôvodnenie použitých metód, výsledky štatistickej analýzy, najlepšie v tabuľkovej forme,

— histologické údaje: zahŕňajú slovné opisy ako aj stupeň závažnosti a skóre výskytu osobitných pozorovaní v súlade s usmerňovacím dokumentom o histopatológii,

— pozorovania *ad hoc*: tieto pozorovania by mali zahŕňať slovné opisy štúdie, ktoré nepatria do uvedených kategórií.

Oznamovanie údajov

43. Dodatok 2 obsahuje hárky na každodenné zaznamenávanie získaných údajov, ktoré možno použiť ako usmernenie na zapisovanie nespracovaných údajov a výpočty súhrnných štatistík. Okrem toho sú k dispozícii oznamovacie tabuľky vhodné na sprostredkovanie zhrnutí údajov o sledovaných parametroch. Oznamovacie tabuľky pre histologické hodnotenia sa nachádzajú v dodatku 2.

Kritériá účinnosti a test prípustnosti/validity

44. Výrazné odchýlky od testovacej metódy budú mať vo všeobecnosti za následok neprijateľné údaje na účely interpretácie alebo podávania správ. Preto sa vypracovali kritériá uvedené v tabuľke 4 ako usmernenie na určenie kvality vykonaného testu, teda všeobecného stavu kontrolných organizmov.

Tabuľka 4

Kritériá účinnosti pre skúšku AMA

Kritérium	Prípustné limity
Testované koncentrácie	Udržiavané na úrovni ≤ 20 % CV (variabilita nameranej testovanej koncentrácie) počas 21-dňového testu.
Úmrtnosť v kontrolných skupinách	≤ 10 % – úmrtnosť v každom jednom replikáte v kontrolných skupinách by nemala prekročiť dve žubrienky.
Minimálne mediánové vývinové štádium kontrolných organizmov na konci testu	57
Rozptyl vývinových štádií v kontrolnej skupine	10. a 90. percentil distribúcie vývinových štádií by sa nemal líšiť o viac ako štyri štádiá.
Rozpustený kyslík	≥ 40 % rozpustnosť vzdušného kyslíka (*)
pH	pH by sa malo udržiavať v rozmedzí 6,5 – 8,5. Rozdiely medzi replikátmi/koncentráciami chemikálie by nemali byť väčšie ako 0,5.
Teplota vody	22° ± 1 °C – rozdiely medzi replikátmi/koncentráciami chemikálie by nemali byť väčšie ako 0,5 °C.
Testované koncentrácie bez zjavnej toxicity	≥ 2
Stav replikátov	≤ 2 replikáty v rámci testu môžu byť narušené.

▼M6

Kritérium	Prípustné limity
Osobitné podmienky na použitie rozpúšťadla	Ak sa použije rozpúšťadlo ako nosič, je nutné použiť kontrolnú skupinu s rozpúšťadlom i kontrolnú skupinu s čistou vodou a uviesť výsledky.
	Štatisticky významné rozdiely medzi kontrolnými skupinami s rozpúšťadlom a kontrolnými skupinami s vodou treba riešiť osobitne. Viac informácií sa nachádza ďalej.
Osobitné podmienky pre statický obnovovací systém	V správe je potrebné uviesť reprezentatívne chemické analýzy vykonané pred obnovením a po ňom.
	Bezprostredne pred obnovením sa musí odmerať hladina amoniaku.
	Bezprostredne pred obnovením sa musia odmerať všetky parametre kvality vody uvedené v tabuľke 1 dodatku 1.
	Obdobie obnovenia by nemalo presiahnuť 72 hodín.
	Vhodný harmonogram kŕmenia (50 % denného prídelu komerčného krmiva pre žubrienky).

(*) Prevzdušňovanie vody možno zabezpečiť pomocou premývačiek. Odporúča sa nastaviť premývačky na úrovne, ktoré žubrienkam nespôsobujú neprimeraný stres.

Validita testu

45. Tieto požiadavky by sa mali splniť na to, aby sa test mohol považovať za prípustný/platný:

Platný pokus pre test stanovený ako negatívny na pôsobenie na štítnu žľazu:

1. Pre každé aplikovanie chemikálie (vrátane kontrolných skupín) nesmie úmrtnosť presiahnuť 10 %. Pre každý replikát nesmie úmrtnosť presiahnuť tri žubrienky, inak sa replikát považuje za narušený.

2. Na analýzu musia byť k dispozícii aspoň dve úrovne koncentrácie chemikálie so všetkými štyrmi nenarušenými replikátmi.

3. Na analýzu musia byť k dispozícii aspoň dve úrovne koncentrácie chemikálie bez zjavnej toxicity.

Platný pokus pre test stanovený ako pozitívny na pôsobenie na štítnu žľazu:

1. Môže sa vyskytnúť úmrtnosť nie viac ako dve žubrienky/replikát v kontrolnej skupine.

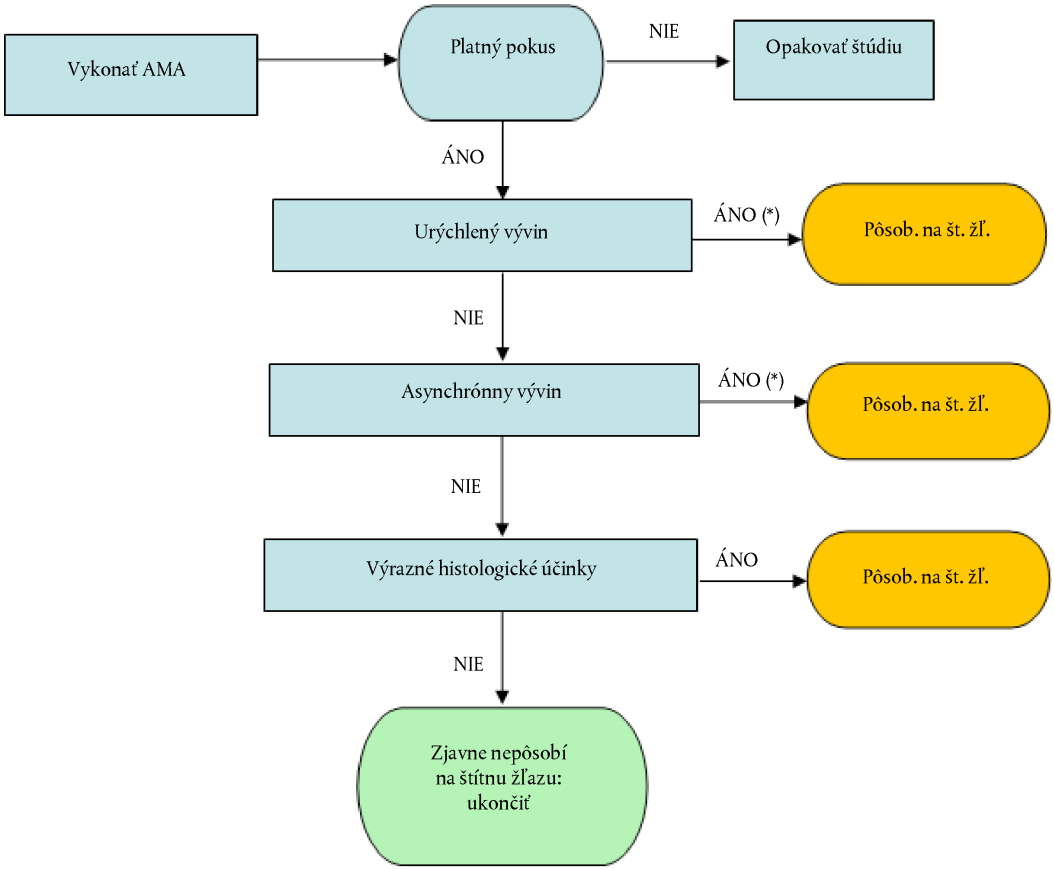
Logická schéma rozhodovania pri vykonávaní skúšky AMA

46. Pre skúšku AMA sa vytvorila logická schéma rozhodovania ako logická pomôcka pri vykonávaní biologickej skúšky a interpretácii jej výsledkov (pozri vývojový diagram na obrázku 3). Podľa tejto logickej schémy rozhodovania sa v podstate vážia sledované parametre tak, že urýchlený vývin asynchrónny vývin a histopatológia štítnej žľazy majú veľkú váhu, kým oneskorený vývin, dĺžka od pysku po kloaku a mokrá telesná hmotnosť, teda parametre, ktoré môžu byť potenciálne ovplyvnené všeobecnou toxicitou, majú menšiu váhu.

▼M6

Obrázok 3

Logická schéma rozhodovania pri vykonávaní skúšky AMA



(*) Niektoré regulačné orgány môžu vyžadovať histologické vyšetrenie napriek výrazným rozdielom v urýchlenom a asynchrónnom vývine. Subjektu vykonávajúcemu tento test sa odporúča, aby sa pred vykonaním testu poradil s príslušnými orgánmi o tom, ktoré sledované parametre sú povinné.

Urýchlený vývin (stanovený podľa vývinovej fázy, SVL a HLL)

47. Je známe, že urýchlený vývin sa vyskytuje len prostredníctvom účinkov, ktoré súvisia s hormónom štítnej žľazy. Môže ísť o účinky na periférne tkanivá, ako je priama interakcia s receptorom hormónu štítnej žľazy (napr. T4) alebo účinky, ktoré menia hladinu hormónu štítnej žľazy v krvnom obehu. V obidvoch prípadoch sa to považuje za dostatočný dôkaz pôsobenia chemikálie na štítnu žľazu. Urýchlený vývin sa vyhodnocuje jedným z dvoch spôsobov. Po prvé, všeobecné vývinové štádium možno vyhodnotiť s použitím štandardizovaného prístupu podľa Nieuwkoopa a Fabera (8). Po druhé, v 7. aj 21. dni možno kvantifikovať konkrétne morfologické znaky, napríklad dĺžku zadných končatín, ktoré jasne súvisia s agonistickými účinkami na receptor hormónu štítnej žľazy. Ak sa zistí štatisticky významný urýchlený vývin alebo väčšia dĺžka zadných končatín, potom z testu vyplýva, že chemikália pôsobí na štítnu žľazu.

▼**M6**

48. Vyhodnotenie testovaných živočíchov z hľadiska prítomnosti urýchleného vývinu v porovnaní s kontrolnou populáciou bude založené na výsledkoch štatistických analýz uskutočnených pre tieto štyri sledované parametre:

— dĺžka zadných končatín (normalizovaná vzhľadom na SVL) v 7. deň štúdie,

— dĺžka zadných končatín (normalizovaná vzhľadom na SVL) v 21. deň štúdie,

— vývinové štádium v 7. deň štúdie,

— vývinové štádium v 21. deň štúdie.

49. Štatistické analýzy dĺžky zadných končatín by sa mali vykonať na základe meraní dĺžky ľavej zadnej končatiny. Dĺžka zadných končatín sa normalizuje podľa pomeru dĺžky zadných končatín a dĺžky od pysku po kloaku jedinca. Následne sa porovnajú priemery normalizovaných hodnôt pre každú úroveň koncentrácie chemikálie. Urýchlenie vývinu sa potom udáva ako významný nárast priemernej dĺžky zadných končatín (normalizovanej) v skupine s aplikovanou chemikáliou v porovnaní s kontrolnou skupinou v 7. deň a/alebo 21. deň štúdie (pozri dodatok 3).

50. Štatistické analýzy vývinového štádia by sa mali vykonať na základe stanovenia vývinových štádií podľa morfologických kritérií opísaných Nieuwkoopom a Faberom (8). K urýchlenému vývinu došlo vtedy, keď sa v multikvantovej analýze zistí významný nárast hodnôt vývinového štádia v skupine s aplikovanou chemikáliou v porovnaní s kontrolnou skupinou v 7. deň a/alebo 21. deň štúdie.

51. V testovacej metóde skúšky AMA sa významný vplyv na ktorýkoľvek zo štyroch uvedených sledovaných parametrov považuje za dostatočný na jednoznačné stanovenie urýchleného vývinu. To znamená, že významný vplyv na dĺžku zadných končatín v určitom časovom bode si nevyžaduje potvrdenie významným vplyvom na dĺžku zadných končatín v inom časovom bode ani významným vplyvom na vývinové štádium v tomto konkrétnom časovom bode. A ďalej, významný vplyv na vývinové štádium v určitom časovom bode si nevyžaduje potvrdenie významným vplyvom na vývinové štádium v inom časovom bode ani významným vplyvom na dĺžku zadných končatín v tomto konkrétnom časovom bode. Váha dôkazov o urýchlenom vývine sa však zvýši ak sa významný vplyv zistí pre viacero sledovaných parametrov.

Asynchrónny vývin (stanovený podľa kritérií vývinového štádia)

52. Asynchrónny vývin je charakterizovaný narušením relatívneho načasovania morfogenézy alebo vývinu rôznych tkanív konkrétnej žubrienky. Nemožnosť jasne stanoviť vývinové štádium organizmu pomocou súboru morfologických sledovaných parametrov považovaných za typické pre príslušné štádium naznačuje, že tkanivá sa počas metamorfózy vyvíjajú asynchrónne. Asynchrónny vývin je ukazovateľom pôsobenia na štítnu žľazu. Jediné známe spôsoby účinku vyvolávajúce asynchrónny vývin sú prostredníctvom pôsobenia chemikálií na periférnu činnosť hormónu štítnej žľazy a/alebo metabolizmus hormónu štítnej žľazy vo vyvíjajúcich sa tkanivách ako sa to zaznamenalo v prípade inhibítorov dejodinázy.

▼**M6**

53. Hodnotenie testovacích živočíchov z hľadiska prítomnosti asynchrónneho vývinu v porovnaní s kontrolnou populáciou bude založené na hodnotení výrazných morfologických znakov testovacích živočíchov v 7. a 21. deň štúdie.

54. Opis normálneho vývinu *Xenopus laevis* od Nieuwkoopa a Fabera (8) poskytuje rámec na identifikáciu poradia normálnej remodelácie tkaniva. Pojem „asynchrónny vývin“ sa osobitne vzťahuje na odchýlky vo vývine výrazných morfologických znakov žubrienok, ktoré znemožňujú konečné stanovenie vývinového štádia podľa kritérií Nieuwkoopa a Fabera (8), lebo hlavné morfologické znaky majú charakteristiky rôznych štádií.

55. Ako napovedá pojem „asynchrónny vývin“, do úvahy sa majú brať len prípady odchýlok v pokroku remodelácie konkrétnych tkanív v porovnaní s pokrokom remodelácie iných tkanív. Niektoré klasické fenotypy zahŕňajú oneskorenie alebo neprítomnosť vzniku predných končatín napriek normálnemu alebo urýchlenému vývinu zadných končatín a tkanív chvosta alebo predčasnú resorpciu žiabier vzhľadom na štádium morfogenézy zadných končatín a resorpcie chvosta. Živočích sa zaznamená ako vyvíjajúci sa asynchrónne ak ho nemožno zaradiť do žiadneho štádia, lebo nespĺňa väčšinu zásadných vývinových kritérií pre dané štádium podľa Niewkoopa a Fabera (8) alebo ak došlo k mimoriadnemu oneskoreniu alebo urýchleniu vývinu jedného alebo viacerých kľúčových znakov (napr. chvost sa úplne resorboval, ale nevytvorili sa predné končatiny). Toto posúdenie sa vykonáva kvalitatívne a malo by vychádzať z preskúmania celého súboru znakov uvádzaných Nieuwkoopom a Faberom (8). Nie je však potrebné zaznamenať vývinové štádium rôznych zásadných znakov pozorovaných živočíchov. Živočíchy zaznamenané ako vyvíjajúce sa asynchrónne sa nezaradia do žiadneho vývinového štádia podľa Nieuwkoopa a Fabera (8).

56. Hlavným kritériom na stanovenie prípadov abnormálneho morfologického vývinu ako „asynchrónneho vývinu“ je teda to, že relatívne načasovanie remodelácie tkaniva a morfogenézy tkaniva sú narušené, zatiaľ čo morfológia postihnutých tkanív nie je zjavne abnormálna. Jedným príkladom na ilustráciu tejto interpretácie výrazných morfologických abnormalít je skutočnosť, že oneskorená morfogenéza zadných končatín vzhľadom na vývin iných tkanív bude spĺňať kritérium „asynchrónneho vývinu“, kým prípady chýbajúcich zadných končatín abnormálnych prstov (napr. ektrodaktýlie, polydaktýlie) alebo iných zjavných malformácií končatín by sa nemali považovať za „asynchrónny vývin“.

57. Hlavné morfologické znaky, ktoré by sa mali hodnotiť z hľadiska koordinovaného vývinu počas metamorfózy, by preto mali zahŕňať morfogenézu zadných končatín, morfogenézu predných končatín, vznik predných končatín, štádium resorpcie chvosta (najmä resorpcie chvostovej plutvy) a morfológiu hlavy (napr. veľkosť žiabier a štádium resorpcie žiabier, morfológiu dolnej čeľuste, vyčnievanie Meckelovej chrupky).

58. V závislosti od spôsobu účinku chemikálie sa môžu objaviť rôzne výrazné morfologické fenotypy. Niektoré klasické fenotypy zahŕňajú oneskorenie alebo neprítomnosť vzniku predných končatín napriek normálnemu alebo urýchlenému vývinu zadných končatín a tkanív chvosta a predčasnú resorpciu žiabier vzhľadom na remodeláciu zadných končatín a chvosta.

▼**M6**

Histopatológia

59. Ak chemikália nespôsobuje zjavnú toxicitu a neurýchľuje vývin ani nespôsobuje asynchrónny vývin, vyhodnotí sa histopatológia štítnej žľazy podľa príslušného usmerňovacieho dokumentu (9). Oneskorenie vývinu je v neprítomnosti toxicity významným ukazovateľom pôsobenia proti štítnej žľaze, ale analýza vývinového štádia je menej citlivá a menej diagnostická ako histopatologická analýza štítnej žľazy. Preto sa v tomto prípade vyžaduje vykonanie histopatologických analýz štítnych žliaz. Vplyv na histológiu štítnej žľazy sa preukázal aj v neprítomnosti vplyvu na vývin. Ak sa zistia zmeny v histopatológii štítnej žľazy, chemikália sa považuje za pôsobiacu na štítnu žľazu. Ak sa nepozorujú žiadne oneskorenia vývinu ani histologické lézie štítnych žliaz, chemikália sa považuje za nepôsobiacu na štítnu žľazu. Odôvodnenie tohto rozhodnutia spočíva v tom, že štítna žľaza je pod vplyvom TSH a každá chemikália, ktorá zmení hladinu hormónu štítnej žľazy v krvnom obehu dostatočne na to, aby zmenila sekréciu TSH, bude mať za následok histopatologické zmeny v štítnej žľaze. Hladinu hormónu štítnej žľazy v krvnom obehu môžu zmeniť rôzne spôsoby a mechanizmy účinku. To znamená, že hoci hladina hormónu štítnej žľazy svedčí o vplyve na štítnu žľazu, nestačí to na určenie, ktorý spôsob alebo mechanizmus účinku je príčinou odozvy.

60. Keďže tento sledovaný parameter nemožno určiť s použitím základných štatistických prístupov, stanovenie vplyvu spojeného s expozíciou chemikálii vykoná patológ odborným posudkom.

Oneskorený vývin (stanovený podľa vývinovej fázy, HLL, BW, SVL)

61. Oneskorený vývin môže byť spôsobený mechanizmami pôsobenia proti štítnej žľaze a prostredníctvom nepriamej toxicity. Mierne oneskorenia vývinu spojené so zjavnými známkami toxicity pravdepodobne nasvedčujú nešpecifickému toxickému účinku. Hodnotenie netyreoideálnej toxicity je základným prvkom testu v záujme zníženia pravdepodobnosti falošných pozitívnych výsledkov. Nadmerná úmrtnosť je evidentnou známkou výskytu iných toxických mechanizmov. Podobne aj mierne spomalenie rastu stanovené na základe mokrej hmotnosti a/alebo SVL nasvedčuje netyreoideálnej toxicite. Zjavné zrýchlenie rastu sa bežne pozoruje v prípade chemikálií, ktoré negatívne ovplyvňujú normálny vývin. Prítomnosť väčších živočíchov preto nevyhnutne neznamená netyreoideálnú toxicitu. Pri stanovení tyreoideálnej toxicity sa však nikdy nemožno spoliehať len na rast. Rast v spojení s vývinovým štádiom a histopatológiou štítnej žľazy by sa mal použiť skôr na stanovenie pôsobenia na štítnu žľazu. Pri stanovovaní zjavnej toxicity by sa mali zvážiť aj ďalšie sledované parametre vrátane edému, krvavých lézií, letargie, zníženej spotreby potravy, nesprávneho/zmeneného plávania atď. Ak sa pri všetkých testovaných koncentráciách vyskytnú známky zjavnej toxicity, testovaná chemikália by sa mala znova vyhodnotiť pri nižších testovaných koncentráciách predtým, než sa určí, či chemikália potenciálne pôsobí alebo nepôsobí na štítnu žľazu.

62. Štatisticky významné oneskorenia vývinu v neprítomnosti iných známok zjavnej toxicity nasvedčujú tomu, že chemikália pôsobí na štítnu žľazu (antagonisticky). V neprítomnosti významných štatistických odoziev môžu tento výsledok podporiť výsledky histopatologického vyšetrenia štítnej žľazy.

▼M6

Štatistické analýzy

63. Štatistické analýzy údajov by podľa možnosti mali vychádzať z postupov uvedených v dokumente Súčasné prístupy k štatistickej analýze údajov o ekotoxicite: návod na používanie (11). Na všetky spojité kvantitatívne sledované parametre (HLL, SVL, mokrá hmotnosť) zodpovedajúce monotónnemu priebehu krivky závislosti dávka-odpoveď sa má použiť Jonckheereho-Terpstrov test aplikovaný zostupne na stanovenie významného účinku chemikálie.

64. V prípade spojitých sledovaných parametrov, ktoré nezodpovedajú monotónnemu priebehu krivky závislosti dávka-odpoveď, sa má vyhodnotiť normalita údajov (podľa možnosti pomocou Shapirovho-Wilkovho testu alebo Andersonovho-Darlingovho testu) a homogenita rozptylu (podľa možnosti pomocou Leveneho testu). Obidva testy sa vykonávajú na rezíduách z analýzy ANOVA. Namiesto týchto formálnych testov normality a homogenity rozptylu možno použiť odborný posudok, ale uprednostňujú sa formálne testy. Ak sa zistí nenormalita alebo heterogenita rozptylu, je potrebné vykonať normalizačnú transformáciu na stabilizáciu rozptylu. Ak majú údaje (možno po transformácii) normálnu distribúciu s homogénnym rozptylom, významný vplyv chemikálie sa stanoví pomocou Dunnettovho testu. Ak majú údaje (možno po transformácii) normálnu distribúciu s heterogénnym rozptylom, významný vplyv chemikálie sa stanoví pomocou Tamhaneho-Dunnettovho alebo T3 testu alebo pomocou Mann-Whitneyho-Wilcoxonovho U testu. Ak nie je možné použiť žiadnu normalizačnú transformáciu, významný vplyv chemikálie sa stanoví pomocou Mann-Whitneyho-Wilcoxonovho U testu s použitím Bonferroniho-Holmovej úpravy hodnôt p. Dunnettov test sa uplatňuje nezávisle od akéhokoľvek F-testu analýzy ANOVA a Mann-Whitneyho test sa uplatňuje nezávisle od celkového Kruskallovho-Wallisovho testu.

65. Významná úmrtnosť sa neočakáva, ale treba ju vyhodnotiť pomocou zostupného Cochranovho-Armitageovho testu ak údaje zodpovedajú monotónnosti odozva na dávku a v ostatných prípadoch pomocou Fisherovho exaktného testu s Bonferroniho-Holmovou úpravou.

66. Významný vplyv chemikálie na vývinové štádium sa stanovuje pomocou zostupnej aplikácie Jonckheereho-Terpstrovho testu na mediány replikátov. Na stanovenie vplyvu sa odporúča použiť aj multikvantový Jonckheereho test od 20. do 80. percentilu, lebo zohľadňuje zmeny v distribučnom profile.

67. Vhodnou jednotkou analýzy je replikát, aby údaje predstavovali mediány pre replikáty ak sa používa Jonckheereho-Terpstrov alebo Mann-Whitneyho U test alebo priemery pre replikáty ak sa používa Dunnettov test. Monotónnosť odozvy na dávku možno posúdiť vizuálne na základe priemerov alebo mediánov pre replikáty alebo koncentrácie chemikálie alebo pomocou už opísaných formálnych testov (11).V prípade menej ako piatich replikátov na koncentráciu chemikálie alebo kontrolnú skupinu by sa podľa možnosti mali použiť verzie s presnou permutáciou Jonckheereho-Terpstrovho testu a Mann-Whitneyho testu. Štatistická významnosť všetkých uvedených testov sa posudzuje na hladine významnosti 0,05.

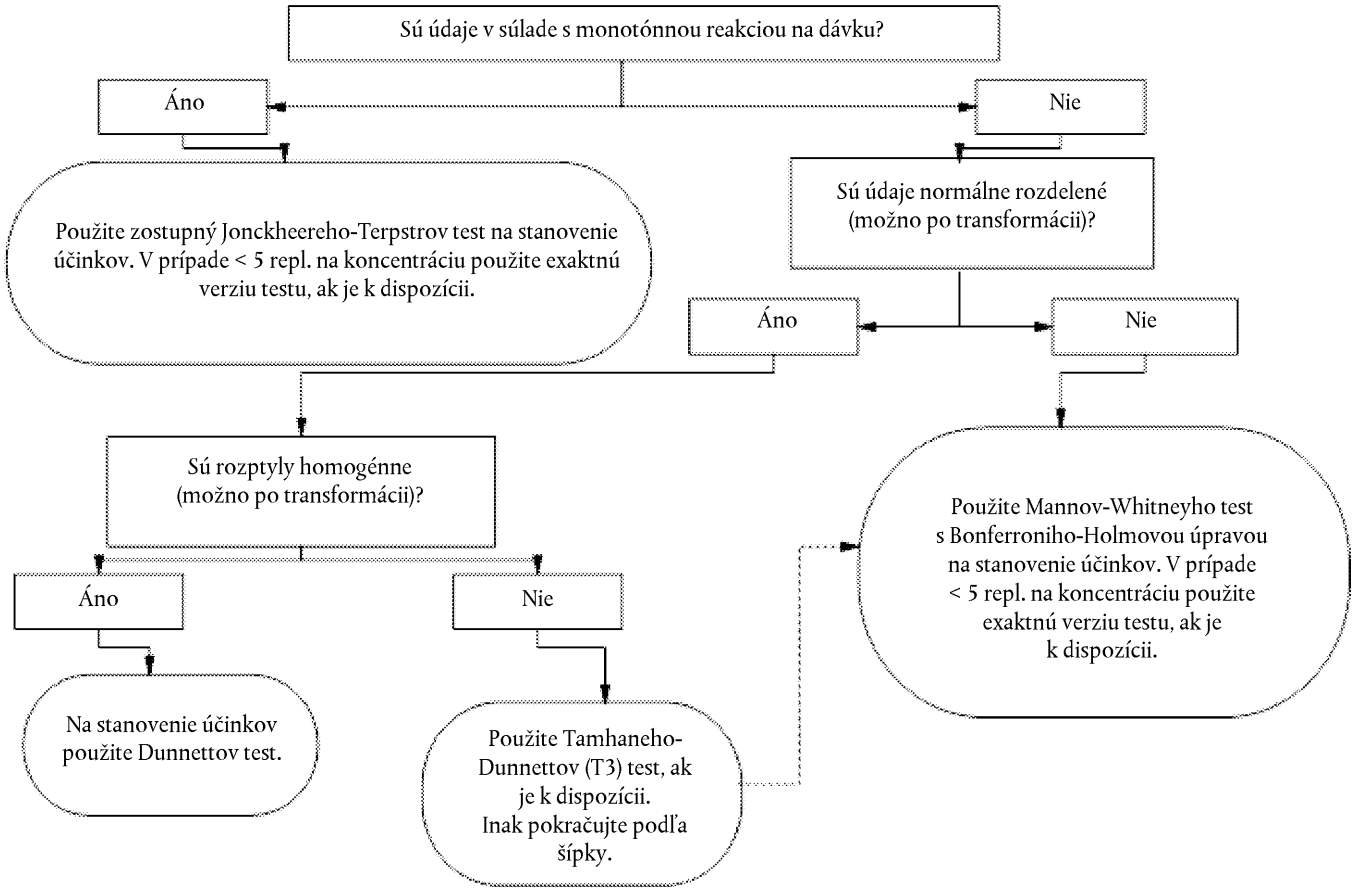
68. Obrázok 4 predstavuje vývojový diagram vykonávania štatistických testov na spojitých údajoch.

▼M6

Obrázok 4

Vývojový diagram štatistických prístupov v prípade údajov o spojitej odozve

Schéma pre spojitú reakciu



▼M6

Osobitné aspekty analýzy údajov

Používanie úrovní narušenia skupiny s určitou koncentráciou chemikálie

69. Pri rozhodovaní, či replikát alebo celá skupina s určitou koncentráciou chemikálie vykazuje zjavnú toxicitu a mala by sa vylúčiť z analýzy, sa zohľadňuje viacero faktorov. Zjavná toxicita je vymedzená > 2 úhynmi v ktoromkoľvek z replikátov, ktoré možno vysvetliť iba toxicitou a nie technickou chybou. Iné známky zjavnej toxicity zahŕňajú krvácanie abnormálne správanie abnormálne vzory plávania anorexiu a akékoľvek iné klinické známky choroby. V prípade subletálnych známok toxicity môžu byť potrebné kvalitatívne hodnotenia, ktoré by sa vždy mali vykonať porovnaním s kontrolnou skupinou s čistou vodou.

Kontrolné skupiny s rozpúšťadlom

70. O použití rozpúšťadla by sa malo uvažovať až ako o poslednej možnosti ak sa zvážili všetky ostatné možnosti aplikovania chemikálie. Ak sa použije rozpúšťadlo, mala by sa zároveň vykonať analýza kontrolnej skupiny s čistou vodou. Po skončení testu by sa malo vykonať hodnotenie potenciálneho vplyvu rozpúšťadla. To sa dosiahne štatistickým porovnaním kontrolnej skupiny s rozpúšťadlom a kontrolnej skupiny s čistou vodou. Najdôležitejšie sledované parametre, ktoré treba zohľadniť v tejto analýze, sú vývinové štádium, SVL a mokrá hmotnosť, lebo môžu byť ovplyvnené netyreoideálnou toxicitou. Ak sa zistia štatisticky významné rozdiely v týchto sledovaných parametroch medzi kontrolnou skupinou s čistou vodou a kontrolnou skupinou s rozpúšťadlom, stanovte sledované parametre štúdie pre merania odozvy s použitím kontrolnej skupiny s čistou vodou. Ak sa nezistí štatisticky významný rozdiel medzi kontrolnou skupinou s čistou vodou a kontrolnou skupinou s rozpúšťadlom v žiadnej z nameraných závisle premenných, stanovte sledované parametre štúdie pre merania odozvy s použitím spojenej kontrolnej skupiny s riediacou vodou a rozpúšťadlom.

Skupiny s aplikovanou chemikáliou, ktoré dosiahli vývinové štádium 60 a vyššie

71. Po štádiu 60 sa pri žubrienkach prejaví zníženie veľkosti a hmotnosti v dôsledku resorpcie tkaniva a zníženia celkového obsahu vody. Merania mokrej hmotnosti a SVL preto nemožno primerane použiť na štatistické analýzy na zistenie rozdielov v rýchlostiach rastu. Údaje o mokrej hmotnosti a dĺžke organizmov v štádiu > NF60 by sa preto mali cenzurovať a nemožno ich použiť na analýzy priemerov alebo mediánov pre replikáty. Na analýzu týchto parametrov rastu možno použiť dva rozdielne prístupy.

72. Jedným prístupom je použiť na štatistické analýzy mokrej hmotnosti a/alebo SVL len žubrienky s vývinovým štádiom 60 alebo nižším. Predpokladá sa, že tento prístup poskytuje dostatočne spoľahlivé informácie o závažnosti možných vplyvov na rast, pokiaľ sa z analýz odstráni iba malá časť testovacích živočíchov (≤ 20 %). Ak sa vývin po štádiu 60 zistí pri zvýšenom počte žubrienok (≥ 20 %) v prípade jednej alebo viacerých nominálnych koncentrácií, mala by sa na všetkých žubrienkach vykonať dvojfaktorová ANOVA s hierarchickou štruktúrou rozptylu na vyhodnotenie vplyvu na rast v dôsledku aplikovania chemikálie so zohľadnením vplyvu vývinu po neskoré štádium na rast. Dodatok 3 obsahuje usmernenie o dvojfaktorovej analýze ANOVA hmotnosti a dĺžky.

LITERATÚRA

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, Paríž.

▼**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. Paríž.

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. Paríž.

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. Paríž.

5. ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. American Society for Testing and Materials aSTM E729-96(2002), Philadelpia, PA.

6. ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus (FETAX). E 1439-98.

7. Kahl,M.D., Russom,C.L., DeFoe,D.L. a Hammermeister,D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, s. 539 – 551.

8. Nieuwkoop,P.D. a 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. Paríž.

10. Dodd,M.H.I. a Dodd,J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts,B. (ed.) academic Press, New York, s. 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. Paríž.

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; s. 69 – 92.

▼**M6**

Dodatok 1

Tabuľka 1

Podmienky pokusu pre 21-dňovú skúšku metamorfózy obojživelníkov

Testovací živočích		Larvy *Xenopus laevis*	
Počiatočné larválne štádium		Štádium 51 podľa Nieuwkoopa a Fabera	
Obdobie expozície		21 dní	
Kritériá výberu lariev		Vývinové štádium a celková dĺžka (voliteľné)	
Testované koncentrácie		Minimálne tri koncentrácie s rozsahom približne jednej rádovej hodnoty	
Režim expozície		Prietokový (prednostne) a/alebo statický obnovovací	
Prietok testovacieho systému		25 ml/min. (výmena celého objemu približne každých 2,7 hod.)	
Základné sledované parametre/dni stanovenia		Úmrtnosť	Denne
		Vývinové štádium	7. a 21. deň
		Dĺžka zadných končatín	7. a 21. deň
		Dĺžka od pysku po kloaku	7. a 21. deň
		Mokrá telesná hmotnosť	7. a 21. deň
		Histológia štítnej žľazy	21. deň
Riediaca voda/laboratórna kontrola		Odchlórovaná voda z vodovodu (filtrovaná pomocou drevného uhlia) alebo rovnocenný laboratórny zdroj	
Hustota lariev		20 lariev/testovaciu nádobu (5/l)	
Testovací roztok/testovacia nádoba		4 – 10 l (minimálna hĺbka vody 10 – 15 cm)/testovacia nádoba zo skla alebo nehrdzavejúcej ocele (napr. 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Opakovanie		4 testovacie nádoby s replikátmi/testovanú koncentráciu a kontrolnú skupinu	
Prípustná úmrtnosť v kontrolných skupinách		≤ 10 % na testovaciu nádobu s replikátom	
Fixácia štítnej žľazy	Počet fixovaných jedincov	Všetky žubrienky (5/replikát sa vyhodnotí na začiatku)	
	Oblasť	Hlava alebo celé telo	
	Fixačná kvapalina	Davidsonov fixačný prostriedok	
Kŕmenie	Potrava	Sera Micron® alebo rovnocenná	
	Množstvo/frekvencia	Kŕmny režim pre potravu Sera Micron® sa nachádzajú v tabuľke 1.	
Osvetlenie	Fotoperióda	12 hod. svetlo: 12 hod. tma	

▼**M6**

	Intenzita	600 – 2 000 luxov (merané na povrchu vody)
Teplota vody		22° ± 1 °C
pH		6,5 – 8,5
Koncentrácia rozpusteného kyslíka		> 3,5 mg/l (> 40 % rozpustnosť vzdušného kyslíka)
Harmonogram odoberania vzoriek na chemickú analýzu		Raz za týždeň (4 odobratia vzorky/test)

▼M6

Dodatok 2

Oznamovacie tabuľky pre nespracované údaje a súhrnné údaje

Tabuľka 1

Všeobecné informácie o testovanej chemikálii

Informácie o chemikálii			
	Uveďte testovanú chemikáliu, jednotky koncentrácie a testované koncentrácie		
	Testovaná chemikália:		
	Jednotky koncentrácie:		
	Testovaná koncentrácia 1		
	Testovaná koncentrácia 2		
	Testovaná koncentrácia 3		
	Testovaná koncentrácia 4		
	Dátum (0. deň):		Uveďte dátum (mm/dd/rr)
	Dátum (7. deň):		Uveďte dátum (mm/dd/rr)
	Dátum (21. deň):		Uveďte dátum (mm/dd/rr)

Tabuľka 2

Hárky na zaznamenanie nespracovaných údajov v 7. a 21. deň

DEŇ X
DÁTUM 00/00/00

	Koncentrácia	Číslo koncentrácie	Číslo replikátu	Číslo jedinca	Identifikátor jedinca	Vývinové štádium	Dĺžka SVL (mm)	Dĺžka zadných končatín (mm)	Mokrá hmotnosť celého organizmu (mg)
RIADOK	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	ŠTÁDIUM	BL	HLL	HMOTNOSŤ
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**

	Koncentrácia	Číslo koncentrácie	Číslo replikátu	Číslo jedinca	Identifikátor jedinca	Vývinové štádium	Dĺžka SVL (mm)	Dĺžka zadných končatín (mm)	Mokrá hmotnosť celého organizmu (mg)
RIADOK	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	ŠTÁDIUM	BL	HLL	HMOT-NOSŤ
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**

	Koncentrácia	Číslo koncentrácie	Číslo replikátu	Číslo jedinca	Identifikátor jedinca	Vývinové štádium	Dĺžka SVL (mm)	Dĺžka zadných končatín (mm)	Mokrá hmotnosť celého organizmu (mg)
RIADOK	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	ŠTÁDIUM	BL	HLL	HMOT-NOSŤ
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**

	Koncentrácia	Číslo koncentrácie	Číslo replikátu	Číslo jedinca	Identifikátor jedinca	Vývinové štádium	Dĺžka SVL (mm)	Dĺžka zadných končatín (mm)	Mokrá hmotnosť celého organizmu (mg)
RIADOK	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	ŠTÁDIUM	BL	HLL	HMOT-NOSŤ
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**

Tabuľka 3

Vypočítané zhrnutia údajov o sledovaných parametroch zo 7. a 21. dňa

		Vývinové štádium			SVL (mm)		Dĺžka zadných končatín (mm)		Hmotnosť (mg)	
TRT	REP	MIN.	MEDIÁN	MAX.	PRIEMER	ŠTD. ODCH.	PRIEMER	ŠTD. ODCH.	PRIEMER	ŠTD. ODCH.
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!

Poznámka: Výpočty hodnôt v bunkách sú prepojené s údajmi v tabuľke 2.

Tabuľka 4

Údaje o dennej úmrtnosti

Deň testu	Dátum	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#Value!																
2	#Value!																
3	#Value!																
4	#Value!																
5	#Value!																

▼**M6**

Deň testu	Dátum	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	#Value!																
7	#Value!																
8	#Value!																
9	#Value!																
10	#Value!																
11	#Value!																
12	#Value!																
13	#Value!																
14	#Value!																
15	#Value!																
16	#Value!																
17	#Value!																
18	#Value!																
19	#Value!																
20	#Value!																
21	#Value!																
Počet replikátov		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Počet aplikovaní chemikálie		0				0				0				0			

Poznámka: Výpočty hodnôt v bunkách sú prepojené s údajmi v tabuľke 1.

Tabuľka 5

Kritériá kvality vody

Expozičný systém (prietokový/statický obnovovací):
Teplota:
Intenzita svetla:
Cyklus svetla a tmy:
Potrava:
Dávka krmiva:
pH vody:
Koncentrácia jódu v testovacej vode:

▼**M6**

Tabuľka 6

Súhrnné chemické údaje

Názov chemikálie:																					
Č. CAS:																					
Deň testu	Dátum	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!																				

Poznámka: Výpočty hodnôt v bunkách sú prepojené s údajmi v tabuľke 1.

▼**M6**

Tabuľka 7

Histopatologické oznamovacie tabuľky pre hlavné kritériá

Dátum: Chemikália: Patológ:

ID kontrolného živočícha – replikát 1	ID kontrolného živočícha – replikát 2	Hypertrofia štítnej žľazy	Atrofia štítnej žľazy	Hypertrofia folikulárnych buniek	Hyperplázia folikulárnych buniek
Spolu:					

ID živočícha dostávajúceho dávku – replikát 1	ID živočícha dostávajúceho dávku – replikát 2	Hypertrofia štítnej žľazy	Atrofia štítnej žľazy	Hypertrofia folikulárnych buniek	Hyperplázia folikulárnych buniek
Spolu:					

ID živočícha dostávajúceho dávku – replikát 1	ID živočícha dostávajúceho dávku – replikát 2	Hypertrofia štítnej žľazy	Atrofia štítnej žľazy	Hypertrofia folikulárnych buniek	Hyperplázia folikulárnych buniek
Spolu:					

ID živočícha dostávajúceho dávku – replikát 1	ID živočícha dostávajúceho dávku – replikát 2	Hypertrofia štítnej žľazy	Atrofia štítnej žľazy	Hypertrofia folikulárnych buniek	Hyperplázia folikulárnych buniek
Spolu:					

▼**M6**

Tabuľka 8

Ďalšie histopatologické kritériá

Dátum: Chemikália: Patológ:

ID kontrolného živočícha – replikát 1	ID kontrolného živočícha – replikát 2	Zväčšenie plochy folikulárnej dutiny	Zmenšenie plochy folikulárnej dutiny
Spolu:			

ID živočícha dostávajúceho dávku – replikát 1	ID živočícha dostávajúceho dávku – replikát 2	Zväčšenie plochy folikulárnej dutiny	Zmenšenie plochy folikulárnej dutiny
Spolu:			

ID živočícha dostávajúceho dávku – replikát 1	ID živočícha dostávajúceho dávku – replikát 2	Zväčšenie plochy folikulárnej dutiny	Zmenšenie plochy folikulárnej dutiny
Spolu:			

ID živočícha dostávajúceho dávku – replikát 1	ID živočícha dostávajúceho dávku – replikát 2	Zväčšenie plochy folikulárnej dutiny	Zmenšenie plochy folikulárnej dutiny
Spolu:			

▼**M6**

Tabuľka 9

Slovné opisy histopatologických nálezov

Dátum:

Chemikália:

Patológ:

		Slovný opis
ID kontrolného živočícha – replikát 1		
ID kontrolného živočícha – replikát 2		
ID živočícha dostávajúceho dávku – replikát 1		
ID živočícha dostávajúceho dávku – replikát 2		

▼**M6**

ID živočícha dostávajúceho dávku – replikát 1		
ID živočícha dostávajúceho dávku – replikát 2		
ID živočícha dostávajúceho dávku – replikát 1		
ID živočícha dostávajúceho dávku – replikát 2		

▼M6

Tabuľka 10

Vzor súhrnnej oznamovacej tabuľky pre deň × (7. alebo 21.) skúšky AMA

		Kontrola				Dávka 1					Dávka 2					Dávka 3				
Sledovaný parameter	Replikát	Priemer	SD	CV	N	Priemer	SD	CV	N	Hodnota p	Priemer	SD	CV	N	Hodnota p	Priemer	SD	CV	N	Hodnota p
Dĺžka zadných končatín (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Priemer:																			
SVL (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Priemer:																			
Mokrá hmotnosť (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Priemer:																			

▼M6

Tabuľka 11

Vzor súhrnnej oznamovacej tabuľky pre údaje o vývinovom štádiu v deň × (7. alebo 21.) skúšky AMA

		Kontrola				Dávka 1					Dávka 2					Dávka 3				
	Replikát	Medián	Min.	Max.	N	Medián	Min.	Max.	N	Hodnota p	Medián	Min.	Max.	N	Hodnota p	Medián	Min.	Max.	Medián	Hodnota p
Vývinové štádium	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Priemer:																			

▼M6

Dodatok 3

Alternatívna analýza hmotnosti a dĺžky v prípade vývinu po neskoré štádium u viac ako 20 % žubrienok pri jednej alebo viacerých koncentráciách

Ak sa vývin po štádiu 60 zistí pri zvýšenom počte žubrienok (≥ 20 %) v prípade jednej alebo viacerých nominálnych koncentrácií, mala by sa na všetkých žubrienkach vykonať dvojfaktorová ANOVA s hierarchickou štruktúrou rozptylu na vyhodnotenie vplyvu na rast v dôsledku aplikovania chemikálie so zohľadnením vplyvu vývinu po neskoré štádium na rast.

Navrhuje sa použiť všetky údaje, ale zohľadniť vplyv vývinu po neskoré štádium. Možno to urobiť pomocou dvojfaktorovej analýzy ANOVA s hierarchickou štruktúrou rozptylu. Definujte parameter LateStage = „Yes“ pre živočícha vo vývinovom štádiu 61 alebo neskoršom. Inak definujte parameter LateStage = „No“. Potom možno vykonať dvojfaktorovú analýzu ANOVA s koncentráciou a premennou LateStage a ich interakciou, pričom Rep(Conc) sa použije ako náhodný faktor a Tadpole(Rep) ako ďalší náhodný vplyv. Parameter rep sa tak stále bude považovať za jednotku analýzy, pričom výsledky budú v zásade rovnaké ako v prípade analýzy priemerov rep*latestage vážených podľa počtu živočíchov na priemer. Ak údaje porušujú požiadavky analýzy ANOVA na normalitu alebo homogenitu rozptylu, na odstránenie tejto prekážky možno použiť normalizovanú transformáciu na poradia.

Okrem štandardných F-testov analýzy ANOVA na vyhodnotenie vplyvu premenných Conc, LateStage a ich vzájomných interakcií možno interakčný F-test „rozrezať“ na dva ďalšie F-testy analýzy ANOVA: jeden pre priemerné reakcie naprieč koncentráciami pre LateStage = „No“ a druhý pre priemerné reakcie naprieč koncentráciami pre LateStage = „Yes“. Ďalšie porovnania priemerov pre jednotlivé aplikované koncentrácie chemikálie s kontrolnými skupinami sa vykonajú pre každú úroveň premennej LateStage. Možno vykonať trendovú analýzu pomocou vhodných kontrastov alebo jednoduché párové porovnania ak existuje dôkaz o nemonotónnom priebehu krivky závislosti dávka-odpoveď na určitej úrovni premennej LateStage. Bonferroniho-Holmova úprava hodnôt p sa robí iba vtedy, keď zodpovedajúci F-rez nie je významný. Možno to urobiť v SAS a pravdepodobne aj v iných štatistických softvérových balíkoch. Komplikácie môžu nastať v prípade, že pri niektorých koncentráciách nie sú žiadne živočíchy v neskoršom štádiu, ale tieto situácie možno vyriešiť jednoduchým spôsobom.

▼**M6**

Dodatok 4

Vymedzenie pojmov

Chemikália:: látka alebo zmes.

Testovaná chemikália:: akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

▼M6

C.39. TEST ROZMNOŽOVANIA CHVOSTOSKOKOV V PÔDE

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 232 (2009). Táto testovacia metóda je určená na posúdenie účinkov chemikálií na výstup reprodukcie chvostoskokov v pôde. Je založená na jestvujúcich postupoch (1) (2). Partenogenetický druh *Folsomia candida* a pohlavne sa rozmnožujúci druh *Folsomia fimetaria* sú dva z najprístupnejších druhov chvostoskokov (*Collembola*), možno ich kultivovať a sú komerčne dostupné. Ak je nutné posudzovať osobitné biotopy, na ktorých tieto dva druhy nežijú, postup je možné rozšíriť aj na iné druhy chvostoskokov ak spĺňajú kritériá validity testu.

2. Pôdne chvostoskoky sú ekologicky významné druhy z hľadiska ekotoxikologického testovania. Chvostoskoky sú šesťnožce s tenkým exoskeletom vysokopriepustným pre vzduch a vodu a predstavujú druhy článkonožcov s odlišným spôsobom a mierou expozície v porovnaní s dážďovkami a druhmi čeľade *Enchytraeidae*.

3. Hustota populácií chvostoskokov v pôde a vrstvách opadaných listov v mnohých suchozemských ekosystémoch zvyčajne dosahuje 10^5 m^{-2} (3) (4). Dospelé jedince zvyčajne merajú 0,5 – 5 mm, pričom ich podiel na celkovej živočíšnej biomase a respirácii v pôde je nízky – odhaduje sa na 1 – 5 % (5). Ich najvýznamnejšou úlohou teda môže byť potenciálna regulácia procesov prostredníctvom predácie mikroorganizmov a mikrofauny. Chvostoskoky sú korisťou širokej škály endogeických a epigeických bezstavovcov ako sú roztoče, stonožky, pavúky, druhy čeľade *Carabidae* a drobčíky. Chvostoskoky sa podieľajú na procesoch rozkladu v kyslých pôdach, kde môžu byť najdôležitejšími pôdnymi bezstavovcami okrem čeľade *Enchytraeidae*, keďže dážďovky a mnohonôžky tu zvyčajne chýbajú.

4. *F. fimetaria* má celosvetové rozšírenie a je bežný vo viacerých druhoch pôdy od piesočnatých po hlinu a od pravého (dokonale rozloženého a premiešaného s pevnou fázou pôdy) po surový (nerozložený) humus. Je to bezoký nepigmentovaný chvostoskok. Bol zaznamenaný v poľnohospodárskych pôdach v celej Európe (6). Je všežravý, pričom súčasť jeho potravy tvoria hubové hýfy, baktérie, prvoky a detrit. Prostredníctvom spásania interaguje s infekciami húb rastlín spôsobenými patogénnymi hubami (7) a môže ovplyvňovať mykorízu ako to je známe v prípade *F. candida*. Tak ako väčšina druhov chvostoskokov, rozmnožuje sa pohlavne, pričom si vyžaduje nepretržitú prítomnosť samčekov, ktorí oplodňujú vajíčka.

5. *F. candida* je takisto rozšírený na celom svete. Hoci vo väčšine prírodných pôd nie je bežný, často sa vyskytuje vo veľmi vysokom počte na miestach bohatých na humus. Je to bezoký nepigmentovaný chvostoskok. Má dobre vyvinutú furku aktívne behá a pri vyrušení pohotovo skáče. Ekologická úloha *F. candida* je podobná úlohe *F. fimetaria*, ale biotopmi sú pôdy bohatšie na organické látky. Rozmnožuje sa partenogeneticky. Samčekovia sa môžu vyskytovať v počte menej než jeden na tisíc jedincov.

PRINCÍP TESTU

6. Synchrónne dospelé (*F. fimetaria*) alebo mladé (*F. candida*) chvostoskoky sú vystavené účinkom rôznych koncentrácií testovanej chemikálie zamiešanej do modifikovanej umelo pripravenej pôdy (8) s použitím 5 % obsahu organickej hmoty (alebo alternatívnej pôdy). Vykonávanie testu možno rozdeliť na dva kroky:

— test na vyhľadávanie rozsahu v prípade, že nie sú k dispozícii dostatočné informácie o toxicite – v tomto teste sú hlavnými sledovanými

▼M6

parametrami úmrtnosť a rozmnožovanie, ktoré sa hodnotia po dvoch týždňoch v prípade *F. fimetaria* a po troch týždňoch v prípade *F. candida*,

— hlavný reprodukčný test, v ktorom sa hodnotí celkový počet mladých jedincov vyprodukovaných rodičovskými živočíchmi a prežitie rodičovských živočíchov. Tento definitívny test trvá tri týždne v prípade *F. fimetaria* alebo štyri týždne v prípade *F. candida*.

Toxické účinky testovanej chemikálie na úmrtnosť a výstup reprodukcie dospelých jedincov sú vyjadrené ako LC_x a EC_x, pričom na základe nelineárnej regresie sa stanoví vhodný model pre údaje s cieľom odhadnúť koncentráciu, ktorá by spôsobila x % úmrtnosť, resp. zníženie výstupu reprodukcie alebo alternatívne ako hodnota NOEC/LOEC (9).

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

7. Je vhodné, aby boli známe fyzikálne vlastnosti, rozpustnosť vo vode, hodnota log K_{ow}, rozdeľovacia konštanta pôda – voda a tlak pary testovanej chemikálie. Potrebné sú aj ďalšie informácie o osude testovanej chemikálie v pôde, napríklad miera fotolýzy a hydrolýzy a biotická degradácia. Je potrebné uviesť aj chemickú identifikáciu testovanej chemikálie podľa názvoslovia IUPAC, číslo CAS, šaržu, dávku, štrukturálny vzorec a čistotu ak sú k dispozícii.

8. Táto testovacia metóda sa môže použiť na chemikálie rozpustné alebo nerozpustné vo vode. Spôsob aplikácie testovanej chemikálie sa však podľa toho bude líšiť. Testovacia metóda nie je použiteľná v prípade prchavých chemikálií, t. j. chemikálií, ktorých Henryho konštanta alebo rozdeľovacia konštanta vzduch – voda je vyššia, ako jeden alebo chemikálií, ktorých tlak pary je vyšší ako 0,0133 Pa pri 25 °C.

VALIDITA TESTU

9. Na to, aby sa výsledky testu mohli považovať za platné, musia kontrolné skupiny bez aplikovanej chemikálie spĺňať tieto kritériá:

— priemerná úmrtnosť dospelých jedincov nesmie presiahnuť 20 % na konci testu,

— priemerný počet mladých jedincov na nádobu by mal byť aspoň 100 na konci testu,

— variačný koeficient vypočítaný pre počet mladých jedincov by mal byť nižší ako 30 % na konci hlavného testu.

REFERENČNÁ CHEMIKÁLIA

10. Referenčná chemikália by sa mala testovať pri koncentrácii EC_{50} pre vybratý druh testovacej pôdy buď v pravidelných intervaloch alebo podľa možnosti v rámci každého testovacieho kola na overenie, že odozva testovacích organizmov v testovacom systéme je na normálnej úrovni. Vhodnou referenčnou chemikáliou je kyselina boritá, ktorá by mala znížiť rozmnožovanie o 50 % (10) (11) pri približne 100 mg/kg suchej hmotnosti pôdy pre obidva druhy.

OPIS TESTU

Testovacie nádoby a vybavenie

11. Vhodnými testovacími nádobami sú nádoby s kapacitou na umiestnenie 30 g vlhkej pôdy. Mali by byť zo skla alebo inertného plastu (netoxického). Použitiu plastových nádob sa však treba vyhnúť ak je expozícia testovanej chemikálii znížená v dôsledku sorpcie. Testovacie nádoby by mali

▼M6

mať prierez umožňujúci, aby bola skutočná hĺbka pôdy v testovacej nádobe 2 – 4 cm. Nádoby by mali mať viečka (napr. zo skla alebo z polyetylénu) navrhnuté tak, aby sa znížilo odparovanie vody a zároveň sa umožnila výmena plynov medzi pôdou a atmosférou. Nádoba by mala byť aspoň čiastočne priehľadná, aby umožňovala prenos svetla.

12. Vyžaduje sa bežné laboratórne vybavenie, konkrétne:

— skrinka na sušenie,

— stereomikroskop,

— pH-meter a luxmeter,

— vhodné presné váhy,

— vhodné vybavenie na reguláciu teploty,

— vhodné vybavenie na reguláciu vlhkosti vzduchu (nie je to nevyhnutné ak sú expozičné nádoby zakryté viečkami),

— inkubátor alebo malá miestnosť s regulovanou teplotou,

— pinzety alebo zariadenie s nízkym sacím prietokom vzduchu.

Príprava testovacej pôdy

13. Používa sa umelo pripravená pôda (8) s obsahom organickej hmoty 5 %. Alternatívne možno použiť prírodnú pôdu, keďže umelo pripravená pôda sa nepodobá prírodnej pôde. Odporúčané zloženie umelo pripravenej pôdy (na základe suchej hmotnosti vysušenej na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C) je takéto:

— 5 % rašeliny vysušenej vzduchom a jemne rozomletej (prijateľná je veľkosť častíc 2 mm ± 1 mm),

— 20 % kaolínu (obsah kaolinitu podľa možnosti nad 30 %),

— približne 74 % priemyselného piesku vysušeného vzduchom (v závislosti od množstva potrebného $CaCO_3$), prevažne jemný piesok s viac ako 50 % častíc s veľkosťou od 50 do 200 mikrónov – presné množstvo piesku závisí od množstva $CaCO_3$ (pozri ďalej), pričom spolu by mali predstavovať až 75 %,

— 1,0 % uhličitanu vápenatého ($CaCO_3$, rozomletého na prach analyticky čistého) na dosiahnutie pH 6,0 ± 0,5, pričom množstvo pridaného uhličitanu vápenatého môže závisieť najmä od kvality/charakteru rašeliny (pozri poznámku 1).

Poznámka 1: Potrebné množstvo $CaCO_3$ bude závisieť od zložiek pôdneho substrátu a malo by sa určiť meraním pH podvzoriek vopred inkubovanej vlhkej pôdy bezprostredne pred testom.*Poznámka 2:* Odporúča sa odmerať pH a prípadne aj pomer C/N, kapacitu katiónovej výmeny (CEC) a obsah organickej hmoty v pôde, aby v neskoršej fáze bolo možné vykonať normalizáciu a lepšie interpretovať výsledky.*Poznámka 3:* Ak to je potrebné, napríklad na osobitné testovacie účely ako testovací a/alebo kultivačný substrát sa môžu použiť aj prírodné pôdy z neznečistených miest. Ak sa však použije prírodná pôda, je nutné uviesť aspoň jej pôvod (miesto odberu), pH, textúru (distribúciu veľkosti častíc), CEC a obsah organickej hmoty a pôda nesmie byť kontaminovaná. V prípade prírodnej pôdy sa odporúča pred jej použitím v hlavnom teste preukázať jej vhodnosť na test a na splnenie kritérií validity testu.

▼M6

14. Suché zložky pôdy sa dôkladne zmiešajú (napr. vo veľkokapacitnom laboratórnom miešači). Maximálna kapacita zadržiavania vody (WHC) umelo pripravenej pôdy sa určí v súlade s postupmi opísanými v dodatku 5. Obsah vlhkosti testovacej pôdy by sa mal optimalizovať tak, aby sa dosiahla kyprá priepustná štruktúra pôdy umožňujúca chvostoskokom vstupovať do pórov. Zvyčajne to je 40 – 60 % maximálnej WHC.

15. Suchá umelo pripravená pôda sa vopred zvlhčí pridaním dostatočného množstva deionizovanej vody na získanie približne polovice konečného obsahu vody dva až sedem dní pred začiatkom testu, aby sa vyvážila/stabilizovala kyslosť. Na stanovenie pH sa použije zmes pôdy a 1 M roztoku chloridu draselného (KCl) alebo 0,01 M roztoku chloridu vápenatého ($CaCl_2$) v pomere 1:5 (podľa dodatku 6). Ak je pôda kyslejšia ako požadovaný rozsah, možno ju upraviť pridaním príslušného množstva $CaCO_3$. Ak je pôda príliš zásaditá, možno ju upraviť pridaním anorganickej kyseliny neškodnej pre chvostoskoky.

16. Vopred zvlhčená pôda sa rozdelí na časti zodpovedajúce počtu testovaných koncentrácií (a podľa potreby referenčnej chemikálii) a kontrolných skupín použitých v teste. Pridajú sa testované chemikálie a obsah vody sa reguluje podľa bodu 24.

Výber a príprava testovacích živočíchov

17. Odporúčaný druh je partenogenetický *F. candida*, lebo v medzilaboratórnej porovnávacej skúške testovacej metódy (11) tento druh splnil kritériá validity pre prežívanie častejšie ako *F. fimetaria*. Ak sa použije alternatívny druh, musí spĺňať kritériá validity uvedené v bode 9. Na začiatku testu majú byť živočíchy dobre kŕmené a majú byť vo veku 23 – 26 dní v prípade *F. fimetaria* a 9 – 12 dní v prípade *F. candida*. Pre každý replikát by počet jedincov *F. fimetaria* mal byť desať samčekov a desať samičiek. V prípade *F. candida* sa má použiť desať samičiek (pozri dodatok 2 a dodatok 3). Synchrónne živočíchy sa náhodne odoberú z misiek a skontroluje sa ich zdravotný a fyzický stav pre každú dávku pridanú do replikátu. Každá skupina 10/20 jedincov sa pridá do náhodne vybratej testovacej nádoby a vyberú sa veľké samičky *F. fimetaria*, aby sa ľahko odlíšili od samčekov *F. fimetaria*.

Príprava testovaných koncentrácií

18. Možno použiť štyri metódy aplikácie testovanej chemikálie: 1. zamiešanie testovanej chemikálie do pôdy s vodou ako nosičom, 2. zamiešanie testovanej chemikálie do pôdy s organickým rozpúšťadlom ako nosičom, 3. zamiešanie testovanej chemikálie do pôdy s pieskom ako nosičom alebo 4. aplikovanie testovanej chemikálie na povrch pôdy. Výber vhodnej metódy závisí od vlastností chemikálie a účelu testu. Vo všeobecnosti sa odporúča zamiešať testovanú chemikáliu do pôdy. Môže však byť potrebné použiť postupy, ktoré sú v súlade s praktickým použitím testovanej chemikálie (napr. nastriekanie kvapalnej formy alebo použitie špeciálnych pesticídových prípravkov ako sú granuly alebo moridlá osiva). Pôda sa takto pripraví pred pridaním chvostoskokov okrem prípadov, keď sa testovaná chemikália pridáva na povrch pôdy – vtedy sa má najskôr chvostoskokom umožniť vstúpiť do pôdy.

Testovaná chemikália rozpustná vo vode

19. Roztok testovanej chemikálie sa pripraví v deionizovanej vode v dostatočnom množstve pre všetky replikáty jednej testovanej koncentrácie. Každý roztok testovanej chemikálie sa pred pridaním do testovacej nádoby dôkladne premieša s jednou dávkou vopred zvlhčenej pôdy.

Testovaná chemikália nerozpustná vo vode

20. V prípade chemikálií nerozpustných vo vode, ale rozpustných v organických rozpúšťadlách, sa testovaná chemikália môže rozpustiť v čo najmenšom možnom objeme vhodného rozpúšťadla (napr. acetónu), ktorý zabezpečí riadne zamiešanie chemikálie do pôdy a jej zmiešanie s požadovanou časťou kremenného piesku. Mali by sa používať iba prchavé rozpúšťadlá. Ak sa použije organické rozpúšťadlo, všetky testované koncentrácie a doplnkový negatívny kontrolný roztok rozpúšťadla by mali obsahovať rovnaké minimálne množstvo rozpúšťadla. Aplikačné nádoby by mali určitý

▼M6

čas zostať nezakryté, aby sa rozpúšťadlo použité na aplikovanie testovanej chemikálie mohlo odpariť, aby tak v tom čase nedošlo k rozptylu toxickej chemikálie.

Testovaná chemikália slabo rozpustná vo vode a v organických rozpúšťadlách

21. V prípade chemikálií, ktoré sú slabo rozpustné vo vode a v organických rozpúšťadlách, sa kremenný piesok, ktorý by mal byť súčasťou celkového množstva piesku pridaného do pôdy, zmieša s množstvom testovanej chemikálie potrebnej na dosiahnutie požadovanej testovanej koncentrácie. Táto zmes kremenného piesku a testovanej chemikálie sa pridá do vopred zvlhčenej pôdy, potom sa pridá primerané množstvo deionizovanej vody, aby sa získal požadovaný obsah vlhkosti a všetko sa dôkladne premieša. Konečná zmes sa rozdelí medzi testovacie nádoby. Postup sa zopakuje pre každú testovanú koncentráciu a pripraví sa aj vhodný kontrolný roztok.

Aplikácia testovanej chemikálie na povrch pôdy

22. Ak je testovaná chemikália pesticíd, môže byť vhodné aplikovať ju na povrch pôdy nastriekaním. Urobí sa to až po pridaní chvostoskokov. Testovacie nádoby sa najskôr naplnia zvlhčeným pôdnym substrátom, pridajú sa živočíchy a potom sa testovacie nádoby odvážia. S cieľom predísť priamej expozícii živočíchov testovanej chemikálii priamym kontaktom, testovaná chemikália sa aplikuje najskôr polhodinu po pridaní chvostoskokov. Testovaná chemikália by sa mala aplikovať na povrch pôdy čo najrovnomernejšie pomocou vhodného laboratórneho striekacieho zariadenia, aby sa simuloval postrek v teréne. Aplikovanie by sa malo uskutočniť pri teplote s odchýlkou ± 2 °C a v prípade vodných roztokov, emulzií alebo disperzií s rýchlosťou aplikovania vody v súlade s odporúčaniami na posúdenie rizika. Rýchlosť sa má overiť s použitím vhodnej kalibračnej metódy. Špeciálne prípravky ako granuly alebo moridlá osiva sa môžu aplikovať spôsobom, ktorý je v súlade s poľnohospodárskym použitím. Po nastriekaní sa pridá potrava.

POSTUP

Podmienky testu

23. Priemerná teplota pri teste by mala byť 20 °C ± 1 °C s rozsahom teplôt 20 °C ± 2 °C. Test sa vykonáva za regulovaných cyklov svetla a tmy (podľa možnosti 12 hodín svetla a 12 hodín tmy) pri osvetlení 400 – 800 luxov v priestore testovacích nádob.

24. Na účely kontroly vlhkosti pôdy sa nádoby odvážia na začiatku, v strede a na konci testu. Úbytok hmotnosti > 2 % sa dopĺňa pridaním deionizovanej vody. Je potrebné poznamenať, že úbytok vody možno znížiť udržiavaním vysokej vlhkosti vzduchu (> 80 %) v testovacom inkubátore.

25. Hodnota pH by sa mala odmerať na začiatku a konci testu na vyhľadávanie rozsahu i hlavného testu. Merania by sa mali vykonať aj na jednej dodatočnej kontrolnej vzorke a jednej dodatočnej vzorke z pôdnych vzoriek s aplikovanou chemikáliou (všetky koncentrácie), ktorá sa pripravila a udržiavala rovnakým spôsobom ako testovacie kultúry, ale bez pridania chvostoskokov.

Postup testu a merania

26. Pre každú testovanú koncentráciu sa množstvo testovacej pôdy zodpovedajúce 30 g hmotnosti v natívnom stave umiestni do testovacej nádoby. Pripravia sa aj vodné kontrolné vzorky bez testovanej chemikálie. Ak sa na aplikáciu testovanej látky používa vehikulum, okrem testovacej série sa

▼M6

má vykonať jedna kontrolná séria obsahujúca len vehikulum. Koncentrácia rozpúšťadla alebo dispergantu musí byť rovnaká ako koncentrácia použitá v testovacích nádobách obsahujúcich testovanú chemikáliu.

27. Jednotlivé chvostoskoky sa opatrne prenesú do každej testovacej nádoby (pridelia sa náhodne) a umiestnia na povrch pôdy. Na účinný prenos živočíchov sa môže použiť zariadenie s nízkym sacím prietokom vzduchu. Počet replikátov pre testované koncentrácie a kontrolné skupiny závisí od použitej koncepcie testu. Testovacie nádoby sa náhodne umiestnia do testovacieho inkubátora a tieto pozície sa raz týždenne znova opätovne randomizujú.

28. V teste *F. fimetaria* sa má použiť 20 dospelých jedincov (desať samčekov a desať samičiek) vo veku 23 – 26 dní na testovaciu nádobu. V 21. deň sa chvostoskoky extrahujú z pôdy a spočítajú. V dávke synchronizovaných jedincov *F. fimetaria* použitej v teste sa pohlavia rozlíšia podľa veľkosti. Samičky sú zreteľne väčšie ako samčekovia (pozri dodatok 3).

29. V teste *F. candida* sa má použiť desať mladých jedincov vo veku 9 – 12 dní na testovaciu nádobu. V 28. deň sa chvostoskoky extrahujú z pôdy a spočítajú.

30. Ako vhodný zdroj potravy sa na začiatku testu a po približne dvoch týždňoch do každej nádoby pridá dostatočné množstvo, napr. 2 – 10 mg, granulovaného sušeného pekárskeho droždia komerčne dostupného na použitie v domácnosti.

31. Na konci testu sa hodnotí úmrtnosť a rozmnožovanie. Po troch týždňoch (*F. fimetaria*) alebo štyroch týždňoch (*F. candida*) sa chvostoskoky extrahujú z testovacej pôdy (pozri dodatok 4) a spočítajú (12). Chvostoskok, ktorého sa nepodarí extrahovať, sa zaznamená ako mŕtvy. Metódy extrakcie a počítania by mali byť validované. Validita zahŕňa účinnosť extrakcie mladých jedincov vyššiu ako 95 %, napr. pridaním známeho počtu do pôdy.

32. Praktické zhrnutie a harmonogram postupu testu sú uvedené v dodatku 2.

Koncepcia testu

Test na vyhľadávanie rozsahu

33. V prípade potreby sa vykoná test na vyhľadávanie rozsahu napríklad s piatimi koncentráciami testovanej chemikálie 0,1; 1,0; 10; 100 a 1 000 mg/kg suchej hmotnosti pôdy v dvoch replikátoch pre každú testovanú koncentráciu a kontrolnú skupinu. Pri rozhodovaní o rozsahu koncentrácií, ktoré sa použijú na test na vyhľadávanie rozsahu, môžu byť užitočné aj dodatočné informácie o úmrtnosti alebo rozmnožovaní chvostoskokov z testov s podobnými chemikáliami alebo z literatúry.

34. Test na vyhľadávanie rozsahu trvá dva týždne pre *F. fimetaria* a tri týždne pre *F. candida*, aby sa zabezpečila produkcia jednej znášky mladých jedincov. Na konci testu sa vyhodnotí úmrtnosť a rozmnožovanie chvostoskokov. Je potrebné zaznamenať počet dospelých jedincov a objavenie sa mladých jedincov.

Hlavný test

35. Na stanovenie hodnoty EC_x (napr. EC_{10}, EC_{50}) by sa malo otestovať dvanásť koncentrácií. Odporúča sa použiť aspoň dva replikáty na každú testovanú koncentráciu chemikálie a šesť kontrolných replikátov. Faktor odstupu sa môže meniť v závislosti od charakteru odozvy na dávku.

▼M6

36. Na stanovenie hodnoty NOEC/LOEC je potrebné otestovať aspoň päť koncentrácií v geometrickom rade. Odporúčajú sa štyri replikáty na každú testovanú koncentráciu chemikálie plus osem kontrolných skupín. Koncentrácie by mali mať faktor odstupu nepresahujúci 1,8.

37. Kombinovaný prístup umožňuje stanovenie hodnôt NOEC/LOEC i ECx. V rámci tohto kombinovaného prístupu sa má použiť osem koncentrácií chemikálie v geometrickom rade. Odporúčajú sa štyri replikáty na každú koncentráciu chemikálie plus osem kontrolných skupín. Koncentrácie by mali mať faktor odstupu nepresahujúci 1,8.

38. Ak sa v teste na vyhľadávanie rozsahu nezistia žiadne účinky pri najvyššej koncentrácii (t. j. 1 000 mg/kg), možno reprodukčný test vykonať ako limitný test s použitím testovanej koncentrácie 1 000 mg/kg a kontrolnej skupiny. Limitný test poskytne príležitosť preukázať, že neexistuje štatisticky významný účinok pri limitnej koncentrácii. Má sa použiť osem replikátov pre pôdu s aplikovanou chemikáliou ako aj pre kontrolnú skupinu.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

39. Hlavným sledovaným parametrom je výstup reprodukcie (napr. počet mladých jedincov vyprodukovaný na testovaciu nádobu). V štatistickej analýze, napr. v postupoch analýzy ANOVA, sa porovnajú populácie s aplikovanou chemikáliou pomocou Studentovho t-testu, Dunnettovho testu alebo Williamsovho testu. Pre priemery jednotlivých populácií sa vypočítajú 95 % intervaly spoľahlivosti.

40. Hlavným kritériom validity, ktoré by sa malo zdokumentovať, je počet prežívajúcich dospelých jedincov v kontrolných skupinách bez aplikovanej chemikálie. Tak ako v prípade testu na vyhľadávanie rozsahu sa do záverečnej správy majú uviesť aj všetky ostatné škodlivé známky.

LC_x a EC_x

41. Hodnoty ECx vrátane príslušných dolných a horných 95 % hraníc spoľahlivosti pre daný parameter sa vypočítajú pomocou vhodných štatistických metód (napr. logistickej alebo Weibullovej funkcie, Spearman-Karberovej metódy s orezanými údajmi alebo jednoduchej interpolácie). Hodnota ECx sa získa vložením hodnoty zodpovedajúcej x % priemeru kontrolnej skupiny do zistenej rovnice. Na účely výpočtu hodnoty EC_{50} alebo akejkoľvek inej hodnoty ECx sa na úplnom súbore údajov vykoná regresná analýza. Hodnota LC_{50} sa zvyčajne odhaduje probitovou analýzou alebo podobnou analýzou zohľadňujúcou binomicky distribuované údaje o úmrtnosti.

NOEC/LOEC

42. Ak je cieľom štatistickej analýzy určiť hodnotu NOEC/LOEC, vyžadujú sa štatistiky pre jednotlivé nádoby (ktoré sa považujú za replikáty). Mali by sa použiť vhodné štatistické metódy podľa dokumentu OECD 54 o súčasných prístupoch k štatistickej analýze údajov o ekotoxicite: návodu na používanie (9). Vo všeobecnosti sa nepriaznivé účinky testovanej chemikálie v porovnaní s kontrolnou skupinou analyzujú pomocou jednostranného testu hypotézy s $p \leq 0,05$.

43. Normálnu distribúciu a homogenitu rozptylu možno otestovať pomocou vhodného štatistického testu, napr. Shapiro-Wilkovho testu, resp. Leveneho testu ($p \leq 0,05$). Možno vykonať jednosmernú analýzu rozptylu (ANOVA) a následné viacnásobné porovnávacie testy. Viacnásobné porovnávania (napr. Dunnettov test) alebo zostupné trendové testy (napr. Williamsov test) sa môžu použiť na vypočítanie, či existujú významné rozdiely ($p \leq 0,05$) medzi kontrolnými skupinami a rôznymi koncentráciami testovanej

▼M6

chemikálie [výber odporúčaného testu podľa dokumentu OECD 54 (9)]. Na stanovenie hodnôt NOEC a LOEC možno použiť aj iné neparametrické metódy (napr. Bonferroniho U-test podľa Holma alebo Jonckheereho-Terpstrov trendový test).

Limitný test

44. Ak sa vykonal limitný test (porovnanie kontrolnej skupiny a len jednej koncentrácie chemikálie) a boli splnené predpoklady parametrických testovacích postupov (normalita, homogenita), metrické reakcie možno vyhodnotiť pomocou Studentovho testu (t-testu). Ak tieto podmienky neboli splnené, možno použiť t-test s nerovnomerným rozptylom (Welchov t-test) alebo neparametrický test, napríklad Mann-Whitneyho U-test.

45. Na stanovenie významných rozdielov medzi kontrolnými skupinami (kontrolná skupina a kontrolná skupina s rozpúšťadlom) možno replikáty z každej kontrolnej skupiny otestovať podľa opisu pre limitný test. Ak sa v týchto testoch nezistia významné rozdiely, všetky replikáty kontrolnej skupiny a kontrolnej skupiny s rozpúšťadlom možno spojiť. V opačnom prípade sa všetky koncentrácie chemikálie majú porovnať s kontrolnou skupinou s rozpúšťadlom.

Protokol o skúške

46. Protokol o skúške musí obsahovať aspoň tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— totožnosť testovanej chemikálie, šaržu, dávku a číslo CAS, čistotu,

— fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie [napr. log Kow, rozpustnosť vo vode, tlak pary, Henryho konštantu (H) a podľa možnosti informácie o osude testovanej chemikálie v pôde] ak sú k dispozícii,

— ak sa netestuje čistá chemikália, je potrebné uviesť zloženie testovanej chemikálie a prídavné látky.

Testovacie organizmy

— identifikácia druhu a dodávateľa testovacích organizmov, opis podmienok chovu a rozsah veku testovacích organizmov.

Podmienky testu

— opis návrhu a postupu experimentu,

— údaje o príprave testovacej pôdy, podrobné špecifikácie ak sa použije prírodná pôda (pôvod, história, distribúcia veľkosti častíc, pH, obsah organickej hmoty),

— kapacita pôdy zadržiavať vodu,

— opis metódy použitej na aplikáciu testovanej chemikálie do pôdy,

— podmienky testu: intenzita svetla, trvanie cyklov svetla a tmy, teplota,

— opis kŕmneho režimu, druh a množstvo potravy použitej v teste, dátumy kŕmenia,

— pH a obsah vody v pôde na začiatku a konci testu (kontrolná skupina a každá koncentrácia chemikálie),

— podrobný opis metódy extrakcie a účinnosť extrakcie.

▼**M6**

Výsledky testu

— počet mladých jedincov zistený v každej testovacej nádobe na konci testu,

— počet dospelých jedincov a ich úmrtnosť (%) v každej testovacej nádobe na konci testu,

— opis zjavných fyziologických alebo patologických príznakov alebo výrazných zmien v správaní,

— výsledky získané s referenčnou testovanou chemikáliou,

— hodnoty NOEC/LOEC, LC_x pre úmrtnosť a EC_x pre rozmnožovanie (väčšinou LC_{50}, LC_{10}, EC_{50} a EC_{10}) s 95 % intervalmi spoľahlivosti, graf vhodného modelu použitého na výpočet, rovnica jeho funkcie a jeho parametre [pozri (9)],

— všetky informácie a pozorovania, ktoré môžu pomôcť pri interpretácii výsledkov,

— spoľahlivosť testu ak sa vykonáva testovanie hypotéz (9),

— odchýlky od postupov opísaných v tejto testovacej metóde a všetky nezvyčajné udalosti počas testu,

— validita testu,

— ak sa odhaduje hodnota NOEC, minimálny zistiteľný rozdiel.

LITERATÚRA

1. Wiles JA a Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. V Handbook of soil invertebrate toxicity tests (ed. H Løkke and CAM Van Gestel), s. 131 – 156. John Wiley a 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. Medzinárodná organizácia pre normalizáciu, Ženeva.

3. Burges A a Raw F (Eds) (1967) Soil Biology. Academic Press. Londýn.

4. Petersen H a 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. 330 s. (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. V 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, s. 261 – 268.

8. kapitola C.36 tejto prílohy, *Predatory mite (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) reproduction test in soil*.

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 Paríž

10. Scott-Fordsmand JJ a Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen 61 s. 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, s. 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. V Soil Zoology (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, Londýn, s. 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

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov

Na túto testovaciu metódu sa vzťahujú tieto vymedzenia pojmov (v tomto teste sú všetky účinné koncentrácie vyjadrené ako hmotnosť testovanej chemikálie na suchú hmotnosť testovacej pôdy):

Chemikália je látka alebo zmes.

NOEC (koncentrácia bez pozorovaného účinku) je koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej sa nepozoruje žiadny účinok. V tomto teste koncentrácia zodpovedajúca hodnote NOEC nemá žiadny štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) v rámci daného času expozície v porovnaní s kontrolnou vzorkou.

LOEC (najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom) je najnižšia koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá má štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) v rámci daného času expozície v porovnaní s kontrolnou vzorkou.

ECx (účinná koncentrácia pre účinok x %) je koncentrácia, ktorá v rámci daného času expozície vyvolá x % účinok na testovacie organizmy v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Napríklad EC_{50} je koncentrácia, pri ktorej sa odhaduje, že v stanovenom čase expozície vyvolá účinok na sledovaný parameter testu v 50 % exponovanej populácie.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

▼M6

Dodatok 2

Hlavné úkony a harmonogram na vykonanie testu chvostoskokov

Kroky testu možno zhrnúť takto:

Čas (deň)	Úkon
– 23. až – 26.	Príprava synchrónnej kultúry *F. fimetaria*
–14.	Príprava umelo pripravenej pôdy (zmiešanie suchých zložiek) Kontrola pH umelo pripravenej pôdy a úprava podľa potreby Odmeranie maximálnej WHC pôdy
– 9. až – 12.	Príprava synchrónnej kultúry *F. candida*
– 2. až – 7.	Predbežné zvlhčenie pôdy
– 1.	Rozdelenie mladých jedincov do dávok Príprava zásobných roztokov a aplikovanie testovanej chemikálie ak je potrebné rozpúšťadlo
0.	Príprava zásobných roztokov a aplikovanie testovanej chemikálie ak ide o pevnú chemikáliu, chemikáliu rozpustnú vo vode alebo ak sa vyžaduje povrchová aplikácia Odmeranie pH pôdy a hmotnosti nádob Pridanie potravy. Pridanie chvostoskokov.
14.	Test na vyhľadávanie rozsahu pre *F. fimetaria*: ukončenie testu, extrakcia živočíchov, odmeranie pH pôdy a straty vody (hmotnosť) Hlavné testy: odmeranie obsahu vlhkosti, doplnenie vody a pridanie 2 – 10 mg droždia
21.	Hlavný test pre *F. fimetaria*: ukončenie testu, extrakcia živočíchov, odmeranie pH pôdy a straty vody (hmotnosť) Test na vyhľadávanie rozsahu pre *F. candida*: ukončenie testu, extrakcia živočíchov, odmeranie pH pôdy a straty vody (hmotnosť)
28.	Hlavný test pre *F. candida*: ukončenie testu, extrakcia živočíchov, odmeranie pH pôdy a straty vody (hmotnosť)

▼M6

Dodatok 3

Usmernenia na chov a synchronizáciu *F. fimetaria* a *F. candida*

Pre každý konkrétny kmeň chvostoskokov je potrebné overiť, či časy a trvania uvedené v tomto usmernení umožňujú dostatočnú synchronizáciu mladých jedincov. Výskyt kladenia vajíčok po prenose dospelých jedincov do čerstvého substrátu a liahnutia vajíčok v zásade určujú vhodný deň na zber vajíčok a synchrónnych mláďat.

Odporúča sa mať trvalú zásobnú kultúru skladajúcu sa napr. z 50 nádob/Petriho misiek. Zásobná kultúra by sa mala udržiavať v dobrom stave výživy kŕmením raz za týždeň, pridávaním vody a odstraňovaním starej potravy a uhynutých jedincov. Príliš málo chvostoskokov na substráte môže mať za následok inhibíciu v dôsledku intenzívnejšieho rastu plesní. Ak sa zásobná kultúra používa na produkciu vajíčok príliš často, môže sa unaviť. Známky únavy sú mŕtve dospelé jedince a pleseň na substráte. Zvyšné vajíčka z produkcie synchrónnych živočíchov možno použiť na oživenie kultúry.

V synchrónnej kultúre *F. fimetaria* sa samčekovia a samičky predovšetkým rozlišujú podľa veľkosti. Samčekovia sú výrazne menší než samičky a pohybujú sa rýchlejšie než samičky. Správny výber pohlavia si vyžaduje malú prax a možno ho potvrdiť mikroskopickou kontrolou pohlavnej oblasti (13).

1. **Chov**

1.a. *Príprava kultivačného substrátu*

Kultivačný substrát je sadra (síran vápenatý) s aktívnym uhlím. Takto sa zabezpečí vlhkosť substrátu, pričom funkciou uhlia je absorbovať odpadové plyny a exkrementy (14) (15). Na uľahčenie pozorovania chvostoskokov možno použiť rôzne formy uhlia. Napríklad v prípade *F. candida* a *F. fimetaria* sa používa práškové uhlie (použitím ktorého sa vytvára čierna/sivá sadra).

Zložky substrátu:

— 20 ml aktívneho uhlia,

— 200 ml destilovanej vody,

— 200 ml sadry,

alebo

— 50 g aktívneho práškového uhlia,

— 260 – 300 ml destilovanej vody,

— 400 g sadry.

Zmes substrátu sa pred použitím nechá sadnúť.

1.b. *Rozmnožovanie*

Chvostoskoky sa držia v nádobách, napr. v Petriho miskách (90 mm × 13 mm), s dnom pokrytým 0,5 cm vrstvou substrátu zo sadry/uhlia. Kultivujú sa pri teplote 20 ± °1 °C a pri cykle svetla a tmy 12: 12 hodín (400 – 800 luxov). Nádoby sa nepretržite udržiavajú vlhké, aby bola relatívna vlhkosť vzduchu v nádobách 100 %. Možno to dosiahnuť prítomnosťou voľnej vody v poréznej sadre, ale bez vytvorenia vodného filmu

▼M6

na povrchu sadry. Strate vody je možné zabrániť vytvorením vlhkého okolitého vzduchu. Všetky mŕtve jedince ako aj plesnivá potrava, sa majú z nádob odstrániť. Na stimuláciu produkcie vajíčok je potrebné preniesť dospelé živočíchy do Petriho misiek s čerstvo pripraveným substrátom zo sadry/uhlia.

1.c. *Zdroj potravy*

Ako jediný zdroj potravy pre *F. candid*a a *F. fimetaria* sa používa granulované sušené pekárske droždie. Čerstvá potrava sa poskytuje raz alebo dvakrát za týždeň, aby sa zabránilo vzniku plesní. Ukladá sa priamo na sadru v malej kôpke. Hmotnosť pridávaného pekárskeho droždia by sa mala prispôsobiť veľkosti populácie chvostoskokov, vo všeobecnosti však stačí 2 – 15 mg.

2. **Synchronizácia**

Test by sa mal vykonať so synchronizovanými živočíchmi, aby sa získali homogénne testované živočíchy toho istého instaru a veľkosti. Synchronizácia okrem toho umožňuje odlíšiť samčekov a samičky *F. fimetaria* vo veku tri týždne a staršie na základe pohlavného dimorfizmu, t. j. rozdielov vo veľkosti. Postup uvedený ďalej je odporúčaním ako získať synchronizované živočíchy (praktické kroky sú voliteľné).

2.a. *Synchronizácia*

— Pripravte nádoby s 0,5 cm vrstvou substrátu zo sadry/uhlia.

— Na účely znesenia vajíčok preneste 150 – 200 dospelých jedincov *F. fimetaria* a 50 – 100 jedincov *F. candida* z najlepších 15 – 20 nádob so zásobnou kultúrou so substrátom starým štyri až osem týždňov do nádob a živočíchy nakŕmte 15 mg pekárskeho droždia. Nedávajte spolu mladé a dospelé jedince, lebo prítomnosť mladých jedincov môže inhibovať produkciu vajec.

— Kultúru uchovávajte pri teplote 20 ± 1 °C (priemer by mal byť 20 ± °C) a cykle svetla a tmy 12 : 12 hodín (400 – 800 luxov). Zabezpečte prísun čerstvej potravy a saturáciu vzduchu vodou. Nedostatok potravy môže mať za následok, že živočíchy sa budú vyprázdňovať na vajíčka, čo môže spôsobiť rast plesní na vajíčkach, prípadne *F. candida* môže požierať vlastné vajíčka. Po desiatich dňoch sa vajíčka starostlivo zozbierajú ihlou a špachtľou a prenesú do „vajíčkového papiera“ (malé kusy filtračného papiera ponorené do kaše zo sadry/uhlia), ktorý sa vloží do nádoby s čerstvým substrátom zo sadry/uhlia. Do substrátu sa pridá niekoľko zrniečok droždia na prilákanie mladých jedincov, aby opustili vajíčkový papier. Je dôležité, aby boli vajíčkový papier a substrát vlhké, inak sa vajíčka dehydrujú. Alternatívne je možné dospelé živočíchy po nakladení vajíčok vybrať zo synchronizačných kultivačných nádob na dva alebo tri dni.

— Po troch dňoch bude väčšina vajíčok na vajíčkovom papieri vyliahnutá, pričom niektoré mladé jedince sa môžu nachádzať pod vajíčkovým papierom.

— Ak chceme získať mladé jedince rovnakého veku, vajíčkový papier s nevyliahnutými vajíčkami vyberieme pinzetou z Petriho misky. Mláďatá, ktoré sú teraz vo veku 0 – 3 dni, zostanú v miske a kŕmia sa pekárskym droždím. Nevyliahnuté vajíčka sa vyradia z testu.

— Vajíčka a vyliahnuté mladé jedince sa kultivujú rovnakým spôsobom ako dospelé jedince. Konkrétne v prípade *F. fimetaria* by sa mali prijať tieto opatrenia: zabezpečiť dostatok čerstvej potravy, odstraňovať starú plesnivú potravu, po týždni mláďatá rozdeliť do nových Petriho misiek ak hustota prekračuje 200.

▼**M6**

2.b. *Manipulácia s chvostoskokmi na začiatku testu*

— Jedince *F. candida* vo veku 9 – 12 dní alebo *F. fimetaria* vo veku 23 – 26 dní sa pozbierajú, napr. nasatím a vypustia do malej nádoby s vlhkým substrátom zo sadry/uhlia. Pomocou binokulárneho mikroskopu sa skontroluje ich fyzický stav (zranené a poškodené živočíchy sa odstránia). Všetky kroky by sa mali vykonať tak, aby boli chvostoskoky stále vo vlhkom prostredí, napr. na mokrom povrchu atď., aby sa predišlo stresu zo sucha.

— Otočte nádobu dnom nahor a poklepte na ňu, aby sa chvostoskoky presunuli do pôdy. Je potrebné neutralizovať statickú elektrinu, inak sa môže stať, že živočíchy budú lietať vo vzduchu alebo sa prilepia na stenu testovacej nádoby a vyschnú. Na neutralizáciu možno použiť ionizátor alebo vlhkú handru umiestnenú pod nádobou.

— Potrava by sa mala rozložiť po celom povrchu pôdy, nemala by zostať len v jednej hrudke.

— Počas prenosu a testovacieho obdobia by sa nemalo klopať na testovacie nádoby ani ich inak fyzicky narúšať, lebo by to mohlo zvýšiť zhutňovanie pôdy a obmedziť interakcie medzi chvostoskokmi.

3. **Alternatívne druhy chvostoskokov**

Na testovanie pomocou tejto testovacej metódy možno použiť aj iné druhy chvostoskokov, napríklad *Proisotoma minuta*, *Isotoma viridis*, *Isotoma anglicana*, *Orchesella cincta*, *Sinella curviseta*, *Paronychiurus kimi*, *Onychiurus folsomi*, *Mesaphorura macrochaeta*. Pred použitím alternatívnych druhov je nutné splniť niekoľko predpokladov:

— majú byť jednoznačne určené,

— treba uviesť dôvody na ich výber,

— je potrebné zabezpečiť, aby bola do testovacej fázy zahrnutá reprodukčná biológia, aby bola potenciálnym cieľom počas expozície,

— je potrebné poznať históriu života: vek dosiahnutia dospelosti, trvanie vývinu vajíčok a instary, ktoré sú podrobené expozícii,

— testovací substrát a poskytovaná potrava musia poskytovať optimálne podmienky na rast a rozmnožovanie,

— variabilita musí byť dostatočne nízka na precízny a presný odhad toxicity.

▼M6

Dodatok 4

Extrakcia a počítanie živočíchov

1. **Možno použiť dve metódy extrakcie.**

1.a. Prvá metóda: Možno použiť extraktor s kontrolovaným teplotným gradientom založený na zásadách MacFadyena (1). Teplo pochádza z vykurovacieho telesa na vrchu extrakčnej skrinky (regulovaného prostredníctvom termistora umiestneného na povrchu vzorky pôdy). Teplota v chladenej kvapaline okolo zbernej nádoby sa reguluje prostredníctvom termistora umiestneného na povrchu zbernej skrinky (umiestnenej pod povrchom pôdy). Termistory sú spojené s programovateľnou ovládacou jednotkou, ktorá zvyšuje teplotu podľa vopred naprogramovaného harmonogramu. Živočíchy sa zbierajú do chladenej zbernej skrinky (2 °C) so spodnou vrstvou zo sadry/uhlia. Extrakcia sa začína pri teplote 25 °C a teplota sa automaticky zvyšuje každých 12 hodín o 5 °C a celkovo trvá 48 hodín. Po 12 hodinách pri 40 °C sa extrakcia končí.

1.b. Druhá metóda: Po pokusnom inkubačnom období sa počet prítomných mladých chvostoskokov stanoví s použitím flotácie. Na tieto účely sa test vykoná v nádobách s objemom približne 250 ml. Na konci testu sa pridá približne 200 ml destilovanej vody. Pôda sa jemne premieša jemným štetcom, aby chvostoskoky stúpali k hladine vody. Do vody sa môže pridať malé množstvo, približne 0,5 ml, čierneho farbiva na tlač fotografií značky Kentmere na uľahčenie počítania zvýšením kontrastu medzi vodou a bielymi chvostoskokmi. Farbivo nie je pre chvostoskoky toxické.

2. **Počítanie:**

Počítanie možno vykonať voľným okom alebo pod svetelným mikroskopom s použitím mriežky umiestnenej na flotačnej nádobe alebo odfotografovaním povrchu každej nádoby a následným spočítaním chvostoskokov na zväčšených alebo premietaných snímkach. Počítanie možno vykonať aj s použitím digitálnych metód spracovania obrazu (12). Všetky postupy je potrebné validovať.

▼M6

Dodatok 5

Určenie maximálnej hodnoty WHC pôdy

Táto metóda na určenie maximálnej kapacity zadržiavania vody (WHC) pôdy sa považuje za vhodnú. Je opísaná v prílohe C normy ISO DIS 11268-2 [Kvalita pôdy. Účinky znečisťujúcich látok na dážďovky (*Eisenia fetida*). Časť 2: Stanovenie účinkov na rozmnožovanie].

Odoberte stanovené množstvo (napr. 5 g) testovacieho pôdneho substrátu pomocou vhodného zariadenia na odber vzoriek (špirálového vzorkovača atď.). Zakryte spodnú časť rúrky kúskom mokrého filtračného papiera a potom ju umiestnite na stojan vo vodnom kúpeli. Rúrku treba postupne ponoriť, kým hladina vody nebude nad povrchom pôdy. Potom sa nechá vo vode približne tri hodiny. Keďže nie je možné zadržať všetku vodu absorbovanú pôdnymi kapilárami, vzorku pôdy treba nechať dve hodiny odvodniť tak, že rúrka sa umiestni na vrstvu veľmi mokrého jemného kremenného piesku v zakrytej nádobe (aby sa zabránilo vysušeniu). Vzorka sa potom odváži vysušená na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C. Kapacita zadržiavania vody (WHC) sa vypočíta takto:

$$\mathrm{WHC(v\ \%\ suchej\ hmotnosti)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Kde:

S= substrát saturovaný vodou + hmotnosť rúrky + hmotnosť filtračného papiera,

T= hmotnosť obalu (hmotnosť rúrky + hmotnosť filtračného papiera),

D= suchá hmotnosť substrátu.

▼**M6**

Dodatok 6

Stanovenie pH pôdy

Táto metóda stanovenia pH pôdy je založená na opise uvedenom v norme ISO DIS 10390: Kvalita pôdy – Stanovenie pH.

Stanovené množstvo pôdy sa suší pri izbovej teplote aspoň 12 hodín. Potom sa pripraví suspenzia pôdy (obsahujúca aspoň 5 g pôdy) v 1 M roztoku chloridu draselného (KCl) analytickej triedy čistoty alebo 0,01 M roztoku chloridu vápenatého ($CaCl_2$) analytickej triedy čistoty, ktorých objem zodpovedá päťnásobku objemu pôdy. Suspenzia sa potom dôkladne pretrepáva päť minút a potom sa nechá usadnúť aspoň na 2 hodiny, ale nie dlhšie ako 24 hodín. Hodnota pH kvapalnej fázy sa potom odmeria pomocou pH-metra, ktorý sa pred každým meraním kalibruje pomocou vhodnej série tlmivých roztokov (napr. pH 4,0 a 7,0).

▼M6

C.40. **TEST TOXICITY ŽIVOTNÉHO CYKLU *CHIRONOMIDAE* V SYSTÉME SEDIMENT – VODA ZA POUŽITIA OBOHATENEJ VODY ALEBO OBOHATENÉHO SEDIMENTU**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 233 (2010). Je určená na posúdenie účinkov celoživotnej expozície sladkovodných dvojkrídlovcov *Chironomus sp.* chemikáliám s úplným pokrytím 1. generácie (generácie P) a začiatku 2. generácie (generácie F1). Je rozšírením existujúcich testovacích metód C.28 (1) a C.27 (15) za použitia expozičného scenára s obohatenou vodou, resp. s obohateným sedimentom. Zohľadňuje existujúce protokoly o testoch toxicity *Chironomus riparius* a *Chironomus dilutus* [predchádzajúci názov *C. tentans* (2)], ktoré boli vypracované v Európe a Severnej Amerike (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) a následne podrobené kruhovým testom (1) (7) (10) (11) (12). Môžu sa použiť aj iné dobre zdokumentované druhy pakomárov, napr. *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). Celkové trvanie expozície je približne 44 dní v prípade *C. riparius* a *C. yoshimatsui* a približne 100 dní v prípade *C. dilutus*.

2. V tejto testovacej metóde je opísaný vodný i sedimentový expozičný scenár. Výber vhodného expozičného scenára závisí od plánovaného použitia testu. Vodný expozičný scenár zahŕňajúci obohatenie vodného stĺpca je určený na simuláciu prípadu postreku pesticídmi a zahŕňa počiatočnú maximálnu koncentráciu v povrchovej vode. Obohacovanie vody je užitočné aj pri iných druhoch expozície (vrátane chemických únikov), ale nie pri akumulačných procesoch v sedimente, ktoré trvajú dlhšie ako testovacie obdobie. V takom prípade a tiež vtedy, keď hlavným spôsobom vstupu pesticídov do vodných útvarov je odtok, môže byť vhodnejšou koncepcia s použitím obohateného sedimentu. V prípade záujmu o iné expozičné scenáre je možné test ľahko prispôsobiť. Ak je napríklad potrebné vyhnúť sa distribúcii testovanej chemikálie medzi vodnú fázu a vrstvu sedimentu a musí sa minimalizovať adsorpcia do sedimentu, možno zvážiť použitie náhradného umelého sedimentu (napr. kremenného piesku).

3. Chemikálie, ktoré si vyžadujú testovanie organizmov žijúcich v sedimente, môžu v sedimentoch dlho pretrvávať. Organizmy žijúce v sedimente môžu byť exponované viacerými spôsobmi. Relatívny význam každého spôsobu expozície a časové obdobie, v ktorom sa každý z nich podieľa na celkových toxických účinkoch, závisia od fyzikálno-chemických vlastností danej chemikálie. V prípade silno adsorbujúcich chemikálií alebo chemikálií, ktoré sa kovalentne viažu na sediment, môže byť významným spôsobom expozície prijímanie kontaminovanej potravy. S cieľom nepodceniť toxicitu vysokolipofilných chemikálií možno zvážiť použitie potravy pridanej do sedimentu pred aplikáciou testovanej chemikálie (pozri bod 31). Je teda možné zahrnúť všetky spôsoby expozície a všetky štádiá života.

4. Merané sledované parametre sú celkový počet vykuklených dospelých jedincov (pre 1. a 2. generáciu), miera vývinu (pre 1. a 2. generáciu), pomer pohlaví úplne vykuklených a živých dospelých jedincov (pre 1. a 2. generáciu), počet šnúr vajíčok na samičku (len pre 1. generáciu) a fertilita šnúr vajíčok (len pre 1. generáciu).

5. Dôrazne sa odporúča použiť umelo pripravený sediment. Umelo pripravený sediment má oproti prírodným sedimentom viaceré výhody:

▼M6

— zníži sa variabilita pokusu, lebo umelo pripravený sediment vytvára reprodukovateľnú „štandardizovanú matricu“ a odstráni sa potreba získať nekontaminovaný čistý sediment,

— testy je možné začať kedykoľvek bez problému sezónnej variability v testovanom sedimente a nie je potrebné sediment vopred upraviť, aby sa odstránila pôvodná fauna,

— nižšie náklady v porovnaní s terénnym zberom dostatočného množstva potrebného na bežné testovanie,

— umelo pripravený sediment umožňuje porovnanie toxicity naprieč štúdiami a následné klasifikovať chemikálie (3).

6. Vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

7. Larvy pakomárov v prvom instare sa exponujú rozsahu koncentrácií testovanej látky v systéme sediment – voda. Test sa začína umiestnením lariev v prvom instare (1. generácia) do testovacích kadičiek obsahujúcich obohatený sediment, prípadne sa testovaná chemikália aplikuje do vody po pridaní lariev. Vyhodnocuje sa vykuklenie pakomárov, čas do vykuklenia a pomer pohlaví úplne vykuklených a živých pakomárov. Vykuklené dospelé jedince sa prenesú do chovných klietok na uľahčenie rojenia, párenia a kladenia vajíčok. Vyhodnotí sa počet vyprodukovaných šnúr vajíčok a ich fertilita. Z týchto šnúr vajíčok sa získajú larvy 2. generácie v prvom instare. Tieto larvy sa umiestnia do čerstvo pripravených testovacích kadičiek (postup obohacovania ako pre 1. generáciu) na účely určenia životaschopnosti 2. generácie prostredníctvom vyhodnotenia vykuklenia, času do vykuklenia a pomeru pohlaví úplne vykuklených a živých pakomárov (schematické znázornenie testu životného cyklu je uvedené v dodatku 5). Všetky údaje sa analyzujú buď prostredníctvom regresného modelu na odhadnutie koncentrácie, ktorá by spôsobila X % pokles príslušného sledovaného parametra alebo prostredníctvom testovania hypotézy na stanovenie koncentrácie bez pozorovaného účinku (NOEC). Pri druhom spôsobe je potrebné pomocou štatistických testov porovnať reakcie na chemikáliu s príslušnými kontrolnými reakciami. Treba poznamenať, že v scenári s obohatenou vodou môžu byť v prípade rýchlo degradujúcich chemikálií neskoršie životné štádiá každej generácie (napr. štádium kukly) vystavené podstatne nižšej úrovni koncentrácie v nadložnej vode ako larvy v 1. instare. Ak to predstavuje problém a je potrebná porovnateľná úroveň expozície každého životného štádia, treba zvážiť tieto úpravy testovacej metódy:

— paralelné pokusy s obohatením v rôznych životných štádiách alebo

— opakované obohatenie (alebo obnovenie nadložnej vody) testovacieho systému počas obidvoch fáz testovania (1. a 2. generácia), pričom intervaly obohacovania (obnovenia) by sa mali prispôsobiť charakteru osudu testovanej chemikálie.

Tieto zmeny sú možné iba v scenári s obohatenou vodou, ale nie v scenári s obohateným sedimentom.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

8. Je potrebné poznať rozpustnosť testovanej chemikálie vo vode, jej tlak pary, hodnotu log K_{ow}, namerané alebo vypočítané delenie do sedimentu a stabilitu vo vode a v sedimente. Mala by byť k dispozícii spoľahlivá analytická metóda so známou a zdokumentovanou presnosťou a detekčným limitom na kvantifikáciu testovanej chemikálie v nadložnej

▼M6

vode, vode nachádzajúcej sa v póroch sedimentu a sedimente. Medzi užitočné informácie patrí štruktúrny vzorec a čistota testovanej chemikálie. Užitočnou informáciou je tiež chemický osud testovanej chemikálie (napr. rozptýlenie abiotická a biotická degradácia atď.). Ďalšie usmernenia pre testované chemikálie s fyzikálno-chemickými vlastnosťami, ktoré sťažujú ich testovanie, sú uvedené v literatúre (16).

REFERENČNÉ CHEMIKÁLIE

9. Referenčné chemikálie sa môžu testovať pravidelne ako prostriedok na zabezpečenie, že sa nezmenila citlivosť laboratórnej populácie. Tak ako v prípade dafnií stačí vykonať 48-hodinový test akútnej toxicity (podľa bodu 17). Kým však nebude k dispozícii validované usmernenie pre akútnu toxicitu, možno zvážiť použitie testu chronickej toxicity podľa kapitoly C.28 tejto prílohy. Príkladmi referenčných toxických látok, ktoré sa úspešne používajú v kruhových testoch a validačných štúdiách, sú: lindán, trifluralín, pentachlórfenol, chlorid kademnatý a chlorid draselný (1) (3) (6) (7) (18).

VALIDITA TESTU

10. Na to, aby bol test platný, musí spĺňať tieto podmienky:

— priemerné vykuklenie v kontrolnej skupine musí byť na konci obdobia expozície na úrovni aspoň 70 % v obidvoch generáciách (1) (7),

— v prípade *C. riparius* a *C. yoshimatsui* by sa 85 % z celkového počtu vykuklených dospelých pakomárov z kontrolnej skupiny v obidvoch generáciách malo objaviť do 12 – 23 dní po vložení lariev v prvom instare do nádob, v prípade *C. dilutus* je prijateľné obdobie 20 – 65 dní,

— priemerný pomer pohlaví úplne vykuklených a živých dospelých jedincov (ako podiel samčekov alebo samičiek) v kontrolnej skupine v obidvoch generáciách by mal byť aspoň 0,4, ale nie vyšší ako 0,6,

— v každej chovnej klietke by počet šnúr vajíčok v kontrolných skupinách 1. generácie mal byť aspoň 0,6 na samičku pridanú do chovnej klietky,

— podiel fertilných šnúr vajíčok v každej chovnej klietke s kontrolnou skupinou 1. generácie by mal byť aspoň 0,6,

— na konci obdobia expozície pre obidve generácie je potrebné odmerať v každej nádobe pH a koncentráciu rozpusteného kyslíka. Koncentrácia kyslíka by mala predstavovať aspoň 60 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka (ASV [1]) a hodnota pH nadložnej vody by mala byť v rozmedzí 6 – 9 vo všetkých testovacích nádobách,

— teplota vody by sa nemala líšiť o viac ako ± 1,0 °C.

OPIS METÓDY

Testovacie nádoby a chovné klietky

11. Larvy sa vystavia vplyvu v 600 ml sklenených kadičkách s priemerom približne 8,5 cm (pozri dodatok 5). Sú vhodné aj iné nádoby, ale musia zaručiť vhodnú hĺbku nadložnej vody a sedimentu. Povrch sedimentu by mal byť dostatočne veľký, aby poskytoval 2 – 3 cm^2 na larvu. Pomer hĺbky vrstvy sedimentu k hĺbke nadložnej vody by mal byť približne 1: 4. Mali by sa použiť chovné klietky (minimálne 30 cm vo všetkých troch rozmeroch) s gázou (veľkosť ôk približne 1 mm) aspoň na vrchu a jednej strane klietky (pozri dodatok 5). Do každej klietky sa umiestni 2 l kryštalizačná miska obsahujúca vodu použitú na testovanie a sediment na

([1]) pri teplote 20 °C za štandardného atmosférického tlaku sa hodnota ASV v sladkej vode rovná 9,1 mg/l (60 % sa rovná 5,46 mg/l).

▼M6

účely kladenia vajíčok. Pomer hĺbky vrstvy sedimentu k hĺbke nadložnej vody by aj v kryštalizačnej miske mal byť približne 1: 4. Po pozbieraní šnúr vajíčok z kryštalizačnej misky sa šnúry umiestnia na 12-jamkové mikrotitračné platne (jedna šnúra na jamku obsahujúcu aspoň 2,5 ml vody z obohatenej kryštalizačnej misky). Platne sa zakryjú vekom, aby sa zabránilo výraznému vyparovaniu. Možno použiť aj iné nádoby vhodné na uchovávanie šnúr vajíčok. S výnimkou mikrotitračných platní by všetky testovacie nádoby a iné prístroje, ktoré prichádzajú do styku s testovacím systémom, mali byť vyrobené výlučne zo skla alebo iného chemicky inertného materiálu (napr. polytetrafluóretylénu).

Výber druhov

12. Uprednostňovaným druhom na použitie v teste je *Chironomus riparius*. Možno použiť aj *C. yoshimatsui*. *C. dilutus* je takisto vhodný, ale je náročnejší na manipuláciu a vyžaduje si dlhšie trvanie testu. Podrobné údaje o kultivačných metódach pre *C. riparius* sú uvedené v dodatku 2. Informácie o kultivačných podmienkach sú k dispozícii aj pre *C. dilutus* (5) a *C. yoshimatsui* (14). Pred testovaním by sa mala potvrdiť identifikácia druhov, ale nevyžaduje sa pred každým testom ak organizmy pochádzajú z internej kultúry.

Sediment

13. Uprednostňuje sa použitie umelo pripraveného sedimentu (známeho aj pod názvom rekonštituovaný, umelý alebo syntetický sediment). Ak sa však použije prírodný sediment, je potrebné ho charakterizovať (aspoň pH, obsah organického uhlíka, odporúča sa aj stanovenie ďalších parametrov ako pomer C/N a granulometria) a nemal by obsahovať žiadnu kontamináciu ani iné organizmy, ktoré by mohli s larvami pakomárov súperiť alebo ich požierať. Takisto sa odporúča, aby sa pred testovaním sedimenty sedem dní uvádzali do testovacích podmienok. Odporúča sa (1) (20) (21) použiť tento umelo pripravený sediment opísaný v literatúre (1):

a) 4 – 5 % (suchá hmotnosť) rašeliny: čo najbližšie k pH 5,5 – 6,0. Je dôležité použiť rašelinu v práškovej forme, jemne rozomletú (veľkosť častíc ≤1 mm) a sušenú iba vzduchom;

b) 20 % (suchá hmotnosť) kaolínu (obsah kaolinitu podľa možnosti nad 30 %);

c) 75 – 76 % (suchá hmotnosť) kremenného piesku (mal by prevládať jemný piesok s viac ako 50 % častíc s veľkosťou od 50 do 200 μm);

d) pridá sa deionizovaná voda, aby sa dosiahla vlhkosť konečnej zmesi v rozsahu 30 – 50 %;

e) pridá sa uhličitan vápenatý chemicky čistej kvality ($CaCO_3$), aby sa pH konečnej zmesi sedimentu upravilo na 7,0 ± 0,5;

f) obsah organického uhlíka v konečnej zmesi by mal byť 2 % (± 0,5 %) a je potrebné ho upraviť pomocou primeraného množstva rašeliny a piesku podľa písmen a) a c).

14. Zdroj rašeliny, kaolínu a piesku by mal byť známy. Je potrebné skontrolovať, či zložky sedimentu neobsahujú chemickú kontamináciu (napr. ťažké kovy, organochlórové zlúčeniny, organofosforové zlúčeniny). Príklad prípravy umelo pripraveného sedimentu je uvedený v dodatku 3.

▼M6

Miešanie suchých zložiek je takisto prípustné ak sa preukáže, že po pridaní nadložnej vody nedochádza k separácii zložiek sedimentu (napr. k vyplaveniu častíc rašeliny) a že rašelina alebo sediment sú v dostatočne uvedené do podmienok.

Voda

15. Každá voda, ktorá vyhovuje chemickým charakteristikám prijateľnej riediacej vody podľa zoznamu uvedeného v dodatkoch 2 a 4, je vhodná ako voda použitá na testovanie. Každá vhodná voda, prírodná voda (povrchová alebo podzemná voda), rekonštituovaná voda (pozri dodatok 2) alebo odchlórovaná voda z vodovodu sú prijateľné ako kultivačná voda a voda použitá na testovanie ak v nej pakomáre prežijú počas celej kultivácie a testovania bez známok stresu. Na začiatku testu by pH vody použitej na testovanie malo mať hodnotu 6 až 9 a celková tvrdosť by nemala byť vyššia ako 400 mg/l pre $CaCO_3$. Ak však existuje podozrenie na interakciu medzi iónmi tvrdosti a testovanou chemikáliou, mala by sa použiť voda s nižšou tvrdosťou (a v takom prípade sa teda nesmie použiť Elendtovo médium M4). Počas celej štúdie by sa mal používať rovnaký druh vody. Charakteristiky kvality vody uvedené v dodatku 4 by sa mali merať najmenej dvakrát za rok alebo ak existuje podozrenie, že sa tieto charakteristiky mohli významne zmeniť.

Zásobné roztoky – obohatená voda

16. a. Testované koncentrácie sa vypočítajú na základe koncentrácií vo vodnom stĺpci, t. j. vody nad sedimentom. Testovacie roztoky vybratých koncentrácií sa zvyčajne pripravujú zriedením zásobného roztoku. Zásobné roztoky sa podľa možnosti pripravujú rozpustením testovanej chemikálie vo vode použitej na testovanie. V niektorých prípadoch môže byť na vytvorenie vhodne koncentrovaného zásobného roztoku potrebné použiť rozpúšťadlá alebo disperganty. Príkladmi vhodných rozpúšťadiel sú acetón, etylénglykolmonoetyléter, etylénglykoldimetyléter, dimetylformamid a trietylénglykol. Ako disperganty možno použiť Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % metylcelulózu a HCO-40. Koncentrácia solubilizačného prostriedku v konečnom testovacom médiu by mala byť minimálna (t. j. ≤ 0,1 ml/l) a mala by byť pre všetky testované koncentrácie chemikálie rovnaká. Ak sa použije solubilizačný prostriedok, nesmie mať žiadne významné účinky na prežívanie na základe porovnania kontrolnej skupiny s rozpúšťadlom s negatívnou (vodnou) kontrolnou skupinou. Je však potrebné vynaložiť maximálne úsilie, aby sa predišlo použitiu takýchto materiálov.

Zásobné roztoky – obohatené sedimenty

16. b. Obohatené sedimenty vybratej koncentrácie sa zvyčajne pripravujú pridaním roztoku testovanej chemikálie priamo do sedimentu. Zásobný roztok testovanej chemikálie rozpustenej v deionizovanej vode sa zmieša s umelo pripraveným sedimentom pomocou valcovne, stroja na miešanie krmív alebo ručným miešaním. Ak je testovaná chemikália slabo rozpustná vo vode, možno ju rozpustiť v čo najmenšom objeme vhodného organického rozpúšťadla (napr. hexánu acetónu alebo chloroformu). Tento roztok sa následne zmieša s 10 g jemného kremenného piesku na každú testovaciu nádobu. Počká sa, kým sa rozpúšťadlo odparí, pričom sa musí z piesku celkom odstrániť. Piesok sa potom zmieša s vhodným množstvom sedimentu. Na rozpustenie, dispergovanie alebo emulgovanie testovanej chemikálie možno použiť iba látky, ktoré sú ľahko prchavé. Treba

▼M6

mať na zreteli, že pri príprave sedimentu je nutné zohľadniť piesok, ktorý pochádza z testovanej chemikálie a pieskovej zmesi (sediment by sa teda mal pripraviť s menším množstvom piesku). Je nutné zabezpečiť, aby sa testovaná chemikália pridávaná do sedimentu v sedimente dôkladne a rovnomerne distribuovala. V prípade potreby možno na účely stanovenia stupňa homogenity analyzovať podvzorky.

KONCEPCIA TESTU

17. Koncepcia testu sa vzťahuje na výber počtu a odstup testovaných koncentrácií, počet nádob pre každú koncentráciu, počet lariev v každej nádobe, počet kryštalizačných misiek a chovných klietok. Ďalej sú opísané koncepcie na stanovenie hodnôt EC_x a NOEC a na vykonanie limitného testu.

Koncepcia regresnej analýzy

18. Účinná koncentrácia (EC_x) a koncentračný rozsah, v ktorom sa skúmajú účinky testovanej chemikálie, sa majú odmerať takým testom, aby sa sledovaný parameter neextrapoloval za hranice vytvorených údajov. Je potrebné vyhýbať sa extrapolácii pod najnižšou alebo nad najvyššou koncentráciou. Pri výbere vhodného rozsahu testovaných koncentrácií môže byť užitočný predbežný test na určenie koncentračného rozsahu testovanej látky podľa testovacej metódy C.27 alebo C.28.

19. Ak sa používa hodnota EC_x, je potrebných aspoň päť koncentrácií a osem replikátov pre každú koncentráciu. Pre každú koncentráciu je potrebné použiť dve chovné klietky (A a B). Osem replikátov sa rozdelí na dve skupiny po štyroch replikátoch pre každú chovnú klietku. Toto zlúčenie replikátov je nutné vzhľadom na počet pakomárov potrebný v klietke na presné vyhodnotenie rozmnožovania. Druhá generácia však už má zase osem replikátov, ktoré pochádzajú z populácií vystavených vplyvu v chovných klietkach. Faktor medzi koncentráciami by nemal byť väčší ako dva (v prípadoch, keď má krivka závislosti reakcie od dávky plytký sklon, možno urobiť výnimku). Počet replikátov pri každej testovanej koncentrácii chemikálie sa môže znížiť na šesť (tri na každú chovnú klietku) ak sa zvýši počet testovaných koncentrácií s rozdielnymi reakciami. Zvýšenie počtu replikátov alebo skrátenie dĺžky intervalov testovaných koncentrácií zvyčajne vedie k užším intervalom spoľahlivosti pre hodnotu EC_x.

Koncepcia odhadu NOEC

20. V prípade prístupu NOEC by sa malo použiť päť testovaných koncentrácií s minimálne ôsmimi replikátmi (štyri na každú chovnú klietku a a B) a faktor medzi koncentráciami by nemal byť väčší ako dva. Počet replikátov by mal byť dostatočný na zabezpečenie primeranej štatistickej spoľahlivosti na zistenie rozdielu 20 % oproti kontrolnej skupine na hladine významnosti 5 % (α = 0,05). V prípade miery vývinu, plodnosti a fertility je zvyčajne vhodná analýza rozptylu (ANOVA) s následným Dunnettovým testom alebo Williamsovým testom (22 – 25). V prípade pomeru vykuklenia a pomeru pohlaví môže byť vhodný Cochranov-Armitageho test, Fisherov exaktný test (s Bonferroniho korekciou) alebo Mantelov-Haentzalov test.

Limitný test

21. Môže sa vykonať limitný test (jedna testovaná koncentrácia a kontrolná/kontrolné skupina/skupiny) ak sa vo voliteľnom predbežnom teste na určenie koncentračného rozsahu testovanej látky nepozorovali žiadne účinky až po maximálnu koncentráciu. Účelom limitného testu je preukázať, že prípadné toxické účinky testovanej chemikálie sa vyskytujú pri vyššej koncentrácii ako testovaná limitná koncentrácia. V prípade vody sa odporúča 100 mg/l a v prípade sedimentu 1 000 mg/kg (suchá hmotnosť). Zvyčajne je na testovanú koncentráciu chemikálie a kontrolnú skupinu

▼M6

potrebných najmenej osem replikátov. Je nutné preukázať primeranú štatistickú spoľahlivosť na zistenie rozdielu 20 % od kontrolnej skupiny na hladine významnosti 5 % (α = 0,05). V prípade metrických reakcií (napr. miery vývinu) je vhodnou štatistickou metódou t-test, pokiaľ údaje spĺňajú požiadavky tohto testu (normalita, homogénne rozptyly). Ak tieto požiadavky nie sú splnené, môže sa použiť t-test s nerovnomerným rozptylom alebo neparametrický test, napríklad Wilcoxonov-Mannov-Whitheyho test. V prípade pomeru vykuklenia je vhodný Fisherov exaktný test.

POSTUP

Podmienky expozície

Príprava systému voda – sediment (obohatenie vody)

22. a. Do každej testovacej nádoby a kryštalizačnej misky sa pridá umelo pripravený sediment (pozri body 13 až 14 a dodatok 3), aby sa vytvorila vrstva hrubá aspoň 1,5 cm (v prípade kryštalizačnej misky môže byť o niečo nižšia), ale maximálne 3 cm. Voda (pozri bod 15) sa pridá tak, aby pomer hĺbky vrstvy sedimentu a hĺbky vody nepresiahol 1: 4. Po príprave testovacích nádob by sa mal systém sediment – voda nechať jemne prevzdušňovať počas približne siedmich dní pred pridaním lariev v prvom instare 1. alebo 2. generácie (pozri bod 14 a dodatok 3). Systém sediment – voda v kryštalizačných miskách sa počas testu neprevzdušňuje, lebo nie je potrebné podporovať prežívanie lariev (šnúry vajíčok sa už pred vyliahnutím pozbierali). S cieľom zabrániť separácii zložiek sedimentu a resuspendovaniu jemného materiálu počas pridávania vody použitej na testovanie do vodného stĺpca môže byť sediment v čase, keď sa naň nalieva voda, prikrytý plastovým kotúčom, ktorý sa ihneď potom odstráni. Iné zariadenia môžu byť tiež vhodné.

Príprava systému voda – sediment (obohatený sediment)

22. b. Obohatené sedimenty pripravené podľa bodu 16. b. sa umiestnia do nádob a kryštalizačnej misky, do ktorých sa pridá nadložná voda, aby sa vytvoril objemový pomer sediment – voda 1: 4. Hĺbka vrstvy sedimentu by mala byt v rozsahu 1,5 – 3 cm (v prípade kryštalizačnej misky môže byť o niečo nižšia). S cieľom zabrániť separácii zložiek sedimentu a resuspendovaniu jemného materiálu počas pridávania testovacej vody do vodného stĺpca môže byť sediment v čase, keď sa naň nalieva voda, prikrytý plastovým kotúčom, ktorý sa ihneď potom odstráni. Iné zariadenia môžu byť tiež vhodné. Keď je obohatený sediment s nadložnou vodou pripravený, je potrebné umožniť delenie testovanej chemikálie zo sedimentu do vodnej fázy (4) (5) (7) (18). To by sa podľa možnosti malo vykonať za rovnakých teplotných a prevzdušňovacích podmienok aké sa použijú v teste. Primeraný čas dosahovania rovnováhy závisí od konkrétneho sedimentu a chemikálie a môže trvať niekoľko hodín až dní a v zriedkavých prípadoch až päť týždňov. Keďže tým by sa poskytol čas na degradáciu mnohých chemikálií, na dosiahnutie rovnováhy sa nečaká, ale odporúča sa, aby obdobie dosahovania rovnováhy trvalo 48 hodín. Ak je však známe, že polčas degradácie chemikálie v sedimente bude dlhý (pozri bod 8), čas dosahovania rovnováhy sa môže predĺžiť. Na konci tohto ďalšieho obdobia dosahovania rovnováhy sa odmeria koncentrácia testovanej chemikálie v nadložnej vode, vode nachádzajúcej sa v póroch sedimentu a sedimente aspoň pri najvyššej koncentrácii a pri jednej nižšej koncentrácii (pozri bod 38). Tieto analytické stanovenia testovanej chemikálie umožňujú výpočet hmotnostnej bilancie a vyjadrenie výsledkov na základe meraných koncentrácií.

23. Testovacie nádoby sa zakryjú (napr. sklenenými platňami). V prípade potreby sa počas štúdie môže dopĺňať hladina vody na pôvodný objem s cieľom kompenzovať vyparovanie. Na tento účel sa použije destilovaná alebo deionizovaná voda, aby sa predišlo hromadeniu solí. Kryštalizačné

▼M6

misky v chovných klietkach nie sú zakryté a môže, ale nemusí byť potrebné upraviť ich s cieľom kompenzovať stratu vody počas testovacieho obdobia, lebo šnúry vajíčok sú v styku s vodou približne len jeden deň a misky sa používajú iba počas krátkej fázy testu.

Pridanie testovacích organizmov

24. Štyri až päť dní pred pridaním lariev v prvom instare 1. generácie sa z kultúry odoberú vaječné hmoty a umiestnia sa do malých nádob s kultivačných médiom. Môže sa použiť staršie médium zo zásobnej kultúry alebo čerstvo pripravené médium. V každom prípade je potrebné do kultivačného média pridať malé množstvo potravy, napr. niekoľko kvapiek filtrátu z jemne rozomletej suspenzie vločkového krmiva pre ryby (pozri dodatok 2). Použijú sa iba čerstvo nakladené vaječné hmoty. Larvy sa zvyčajne začnú liahnuť niekoľko dní po nakladení vajíčok (dva až tri dni v prípade *C. riparius* pri teplote 20 C a jeden až štyri dni v prípade *C. dilutus* pri teplote 23 °C a *C. yoshimatsui* pri teplote 25 °C) a rast lariev prebieha v štyroch instaroch, z ktorých každý trvá štyri až osem dní. V teste sa použijú larvy v prvom instare (maximálne 48 hodín po vyliahnutí). Instarové štádium lariev je potenciálne možné skontrolovať podľa šírky hlavového segmentu (7).

25. Dvadsať lariev v prvom instare 1. generácie sa pomocou tupej pipety náhodne rozdelí do jednotlivých testovacích nádob obsahujúcich systém sediment – voda. Prevzdušňovanie vody sa počas pridávania lariev do testovacích nádob preruší a zostane prerušené počas 24 hodín po pridaní lariev (pozri bod 32). Podľa použitej koncepcie testu (pozri body 19 a 20) je počet lariev použitých pri každej koncentrácii aspoň 120 (šesť replikátov na koncentráciu) v prípade použitia hodnoty EC_x a 160 v prípade prístupu NOEC (osem replikátov na koncentráciu). V koncepcii s obohateným sedimentom sa expozícia začína pridaním lariev.

Obohatenie nadložnej vody

26. Dvadsaťštyri hodín po pridaní lariev v prvom instare 1. generácie sa testovaná chemikália aplikuje do nadložného vodného stĺpca a znova sa začne s jemným prevzdušňovaním (pokiaľ ide o možné zmeny koncepcie testu, pozri bod 7). Pod povrch vody sa pomocou pipety aplikujú malé množstvá zásobných roztokov testovanej chemikálie. Nadložná voda sa potom opatrne premieša, aby sa nenarušil sediment. V koncepcii s obohatenou vodou sa expozícia začína obohatením vody (t. j. jeden deň po pridaní lariev).

Zber vykuklených dospelých jedincov

27. Vykuklené pakomáre 1. generácie sa z testovacích nádob zbierajú aspoň raz, ale podľa možnosti dvakrát denne (pozri bod 36) s použitím odsávačky, exhaustora alebo podobného zariadenia (pozri dodatok 5). Treba dbať najmä na to, aby sa dospelé jedince nepoškodili. Pozbierané pakomáre zo štyroch testovacích nádob z jednej skupiny s aplikovanou chemikáliou sa vypustia do chovnej klietky, do ktorej boli vopred pridelené. V deň prvého vykuklenia (samčekov) sa do kryštalizačných misiek pipetou aplikuje malý objem zásobného roztoku testovanej chemikálie pod vodnú hladinu (koncepcia s obohatenou vodou). Nadložná voda sa

▼M6

potom opatrne premieša, aby sa nenarušil sediment. Koncentrácia testovanej chemikálie v kryštalizačnej miske je nominálne rovnaká ako v nádobách s aplikovanou chemikáliou, ktoré sú priradené k danej chovnej klietke. V prípade koncepcie s obohateným sedimentom sa kryštalizačné misky pripravia približne na 11. deň po začatí expozície (t. j. po pridaní lariev 1. generácie), aby mohlo dôjsť k dosihnutiu rovnováhy počas približne 48 hodín pred nakladením prvých šnúr vajíčok.

28. Šnúry vajíčok sa pozbierajú z kryštalizačnej misky v chovnej klietke pomocou pinzety alebo tupej pipety. Každá šnúra vajíčok sa umiestni do nádoby obsahujúcej kultivačné médium z kryštalizačnej misky, z ktorej bola odobratá (napr. do jamky v 12-jamkovej mikrotitračnej platni aspoň s 2,5 ml média). Nádoby so šnúrami vajíčok sa zakryjú vekom, aby sa zabránilo výraznému vyparovaniu. Šnúry vajíčok sa uchovávajú na pozorovanie aspoň šesť dní po tom ako sa nakladú, aby sa mohli klasifikovať ako fertilné alebo nefertilné.

Na účely začiatku 2. generácie sa aspoň tri, ale radšej šesť fertilných šnúr vajíčok vyberie z každej chovnej klietky, pridá sa trocha potravy a nechá sa vyliahnuť. Tieto šnúry vajíčok by mali byť nakladené na vrchole obdobia kladenia vajíčok, ktorý sa v kontrolných skupinách za normálnych okolností vyskytuje okolo 19. dňa testu. V ideálnom prípade sa 2. generácia pre všetky skupiny s aplikovanou chemikáliou začína v ten istý deň, ale v dôsledku účinkov súvisiacich s chemikáliou na vývin lariev to nie je vždy možné. V takom prípade sa 2. generácie pre vyššie koncentrácie môžu začať neskôr ako pre nižšie koncentrácie a kontrolnú skupinu (s rozpúšťadlom).

29. a. V prípade koncepcie s obohatenou vodou sa systém sediment – voda pre 2. generáciu pripraví aplikovaním testovanej chemikálie do nadložného vodného stĺpca približne 1 hodinu pred pridaním lariev v prvom instare do testovacích nádob. Pod povrch vody sa pomocou pipety aplikujú malé množstvá roztokov testovanej chemikálie. Nadložná voda sa potom opatrne premieša, aby sa nenarušil sediment. Po obohatení sa začne mierne prevzdušňovanie.

29. b. V prípade koncepcie s obohateným sedimentom sa expozičné nádoby obsahujúce systém sediment – voda pre 2. generáciu pripravia rovnakým spôsobom ako v prípade 1. generácie.

30. Dvadsať lariev v prvom instare (maximálne 48 hod. po vyliahnutí) 2. generácie sa pomocou tupej pipety náhodne rozdelí do jednotlivých testovacích nádob obsahujúcich systém obohatený sediment – voda. Prevzdušňovanie vody by sa počas pridávania lariev v prvom instare do testovacích nádob malo prerušiť a malo by zostať prerušené počas ďalších 24 hodín po pridaní lariev. Podľa použitej koncepcie testu (pozri body 19 a 20) je počet lariev použitých pri každej koncentrácii aspoň 120 (šesť replikátov na koncentráciu) v prípade použitia hodnoty EC_x a 160 v prípade prístupu NOEC (osem replikátov na koncentráciu).

Potrava

31. Je nevyhnutné, aby sa larvy v testovacích nádobách kŕmili podľa možnosti každý deň alebo najmenej trikrát do týždňa. V prvých desiatich dňoch vývinu je pre mladé larvy vhodné krmivo pre ryby (suspenzia vo vode alebo jemne rozomletá potrava, napr. Tetra-Min alebo Tetra-Phyll, bližšie informácie pozri v dodatku 2) v dennom množstve 0,25 – 0,5 mg (0,35 – 0,5 mg pre *C. yoshimatsui*) na jednu larvu. Pre staršie larvy môže byť potrebné o niečo väčšie množstvo potravy: denné množstvo 0,5 – 1,0 mg na jednu larvu by malo po zvyšok testu postačovať. Ak sa pozoruje rast plesní alebo ak sa v kontrolných nádobách pozoruje úmrtnosť, prídel potravy by sa mal vo všetkých testovacích a kontrolných nádobách znížiť. Ak nie je možné vznik plesní zastaviť, test je potrebné zopakovať.

Toxikologický význam expozície prostredníctvom požitia je vo všeobecnosti vyšší v prípade chemikálií s vysokou afinitou k organickému uhlíku

▼M6

alebo chemikálií, ktoré sa kovalentne viažu na sediment. Preto sa pri testovaní chemikálií s týmito vlastnosťami môže do umelo pripraveného sedimentu pred stabilizačným obdobím pridať množstvo potravy potrebné na zabezpečenie prežitia a prirodzeného rastu lariev v závislosti od regulačných požiadaviek. S cieľom predísť zhoršeniu kvality vody sa má namiesto krmiva pre ryby použiť rastlinný materiál, napr. sa môže pridať 0,5 % (suchá hmotnosť) jemne rozomletých listov príhľavy dvojdomej (*Urtica dioica*), moruše (*Morus alba*), ďateliny plazivej (*Trifolium repens*), špenátu (*Spinacia oleracea*) alebo iného rastlinného materiálu (*Cerophyl* alebo *α*-celulóza). Pridanie celej dávky zdroja organickej potravy do sedimentu pred obohatením nie je triválne, pokiaľ ide o kvalitu vody a biologické vlastnosti (21) ani nejde o štandardizovanú metódu, no z posledných štúdií vyplýva, že táto metóda funguje (19) (26). Dospelé pakomáre v chovnej klietke normálne nepotrebujú žiadne kŕmenie, ale plodnosť a fertilita sa zvýšia, keď sa ako zdroj potravy pre vykuklené dospelé jedince použije vatový tampón napustený nasýteným sacharózovým roztokom (34).

Podmienky inkubácie

32. Po 24 hodinách od pridania lariev v prvom instare obidvoch generácií sa zabezpečí jemné prevzdušňovanie nadložnej vody v testovacích nádobách a pokračuje sa v ňom počas celého testu (treba dbať na to, aby koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesla pod 60 % ASV). Prevzdušňovanie sa zabezpečí pomocou sklenenej Pasteurovej pipety, ktorej vývod sa upevní 2 – 3 cm nad vrstvou sedimentu tak, aby bol prietok niekoľko bublín za sekundu. Ak sa testujú prchavé chemikálie, je potrebné zvážiť možnosť, že systém sediment – voda sa nebude prevzdušňovať, zároveň sa však musí splniť kritérium validity minimálne 60 % ASV (bod 10). Ďalšie usmernenia sa nachádzajú v literatúre (16).

33. Test s *C. riparius* sa vykonáva pri konštantnej teplote 20 °C (± 2 °C). V prípade *C. dilutus* a *C. yoshimatsui* sa odporúča teplota 23 °C, resp. 25 °C (± 2 °C). Použije sa 16-hodinová fotoperióda, pričom intenzita svetla by mala byť 500 – 1 000 luxov. V chovných klietkach možno navyše pridať jednohodinovú fázu úsvitu a súmraku.

Trvanie expozície

34. Koncepcia s obohatenou vodou: obdobie expozície 1. generácie sa začína, keď sa testovaná chemikália aplikuje do nadložnej vody v testovacej nádobe (čo je jeden deň po vložení lariev – pokyny na možné zmeny koncepcie expozície sa nachádzajú v bode 7). Expozícia 2. generácie lariev sa začína ihneď, lebo sa vkladajú do systému sediment – voda, ktorý už bol obohatený. Maximálne trvanie expozície pre 1. generáciu je 27 dní a pre 2. generáciu 28 dní (larvy 1. generácie strávia jeden deň v nádobách bez expozície) v prípade *C. riparius* a *C. yoshimatsui*. Vzhľadom na prekrývanie je celkové trvanie testu približne 44 dní. V prípade *C. dilutus* je maximálne trvanie expozície 64 dní pre 1. generáciu a 65 dní pre 2. generáciu. Celkové trvanie je približne 100 dní.

Koncepcia s obohateným sedimentom: expozícia sa začína pridaním lariev a trvá maximálne 28 dní pre obe generácie v prípade *C. riparius* a *C. yoshimatsui* a maximálne 65 dní pre obe generácie v prípade *C. dilutus*.

Pozorovania

Vykuklenie

35. Určí sa čas vývinu a celkový počet úplne vykuklených a živých samčích a samičích pakomárov pre obidve generácie. Samčekovia sa ľahko identifikujú podľa obrvených tykadiel a tenkého tela.

▼M6

36. Testovacie nádoby pre obidve generácie je potrebné pozorovať najmenej trikrát do týždňa s cieľom vizuálne vyhodnotiť každé abnormálne správanie lariev (napr. opustenie sedimentu, nezvyčajné plávanie) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Počas obdobia vykuklovania, ktoré v prípade *C. riparius* a *C. yoshimatsui* začína približne 12 dní po vložení lariev (20 dní v prípade *C. dilutus*), sa vykuklené pakomáre aspoň raz, ale podľa možnosti dvakrát denne (skoro ráno a neskoro popoludní) spočítajú a určí sa ich pohlavie. Po identifikácii sa pakomáre 1. generácie opatrne vyberú z nádob a prenesú do chovnej klietky. Pakomáre 2. generácie sa po identifikácii vyberú a usmrtia. Všetky šnúry vajíčok 1. generácie nakladené v testovacích nádobách sa majú jednotlivo pozbierať a preniesť aspoň s 2,5 ml natívnej vody na 12-jamkové mikrotitračné platne (alebo iné vhodné nádoby) zakryté vekom, aby sa zabránilo výraznému vyparovaniu. Zaznamená sa tiež počet mŕtvych lariev a viditeľných kukiel, ktoré sa nevykuklili. Príklady chovnej klietky, testovacej nádoby a exhaustora sú uvedené v dodatku 5.

Rozmnožovanie

37. Účinky na rozmnožovanie sa posudzujú na základe počtu šnúr vajíčok vyprodukovaných 1. generáciou pakomárov a fertility týchto šnúr vajíčok. Raz denne sa šnúry vajíčok pozbierajú z kryštalizačnej misky, ktorá je umiestnená v každej chovnej nádobe. Šnúry vajíčok sa majú pozbierať a preniesť aspoň s 2,5 ml natívnej vody na 12-jamkovú mikrotitračnú platňu (jedna šnúra vajíčok do každej jamky) alebo iných vhodných nádob zakrytých vekom, aby sa zabránilo výraznému vyparovaniu. Pre každú šnúru vajíčok sa zdokumentujú tieto vlastnosti: deň produkcie, veľkosť (normálna, t. j. 1,0 cm ± 0,3 cm alebo malá, zvyčajne ≤ 0,5 cm), štruktúra (normálna = tvar banánu so špirálovou šnúrou vajíčok alebo abnormálna, napr. šnúra vajíčok bez špirály) a fertilita (fertilná alebo nefertilná). V priebehu šiestich dní po nakladení sa vyhodnotí fertilita šnúry vajíčok. Šnúra vajíčok sa považuje za fertilnú, keď sa vyliahne aspoň jedna tretina vajíčok. Celkový počet samičiek pridaných do chovnej klietky sa použije na výpočet počtu šnúr vajíčok na samičku a počtu fertilných šnúr vajíčok na samičku. Ak to je potrebné, počet vajíčok na šnúru vajíčok možno odhadnúť nedeštruktívnym spôsobom pomocou kruhovej metódy počítania (opísanej v odkazoch 32 a 33).

Analytické merania

Koncentrácia testovanej chemikálie

38. Vzorky nadložnej vody, vody nachádzajúcej sa v póroch sedimentu a sedimentu sa majú analyzovať minimálne na začiatku expozície (v prípade obohacovania vody najlepšie jednu hodinu po aplikácii) a na konci testu a to pri najvyššej koncentrácii a jednej nižšej koncentrácii. Vzťahuje sa to na nádoby s obidvoma generáciami. Z kryštalizačných misiek v chovnej klietke sa analyzuje len nadložná voda, lebo práve s ňou prichádzajú do styku šnúry vajíčok (v prípade koncepcie s obohateným sedimentom možno zvážiť analytické potvrdenie koncentrácie v sedimente). Podľa potreby možno počas testu vykonať aj ďalšie merania sedimentu, vody nachádzajúcej sa v póroch sedimentu a nadložnej vody. Tieto stanovenia koncentrácie testovanej chemikálie poskytujú informácie o správaní/delení testovanej chemikálie v systéme voda – sediment. Odoberanie vzoriek sedimentu a vody nachádzajúcej sa v póroch sedimentu na začiatku a počas testu (pozri bod 39) si vyžaduje ďalšie testovacie nádoby na vykonanie analytických stanovení. Merania v sedimente v prípade koncepcie s obohatenou vodou nemusia byť potrebné ak sa delenie testovanej chemikálie medzi vodu a sediment jednoznačne určilo v štúdii

▼M6

voda/sediment pri porovnateľných podmienkach (napr. pomer sedimentu k vode, druh aplikácie, obsah organického uhlíka v sedimente) alebo ak sa preukáže, že namerané koncentrácie v nadložnej vode zostávajú v rozsahu 80 – 120 % nominálnych alebo nameraných prvotných koncentrácií.

39. Ak sa vykonajú prostredné merania (napr. v 7. a/alebo 14. deň) a ak sú na analýzu potrebné veľké vzorky, ktoré nemožno odobrať z testovacích nádob bez ovplyvnenia testovacieho systému analytické stanovenia je potrebné vykonať na vzorkách z ďalších testovacích nádob, s ktorými sa zaobchádzalo rovnakým spôsobom (vrátane prítomnosti testovacích organizmov), ale ktoré sa nepoužili na biologické pozorovania.

40. Na izolovanie intersticiálnej (= pórovej) vody je odporúčaným postupom centrifugácia napr. pri 10 000 g a 4 °C počas 30 minút. Ak sa však preukáže, že testovaná chemikália sa na filtroch neadsorbuje, môže byť prijateľná aj filtrácia. V niektorých prípadoch nemusí byť možné analyzovať koncentrácie vo vode nachádzajúcej sa v póroch sedimentu, lebo objem vzorky môže byť príliš malý.

Fyzikálno-chemické parametre

41. Je potrebné vhodným spôsobom odmerať pH, rozpustený kyslík v testovacej vode a teplotu vody v testovacích nádobách a kryštalizačných miskách (pozri bod 10). Tvrdosť a amoniak sa merajú v kontrolných nádobách a v jednej testovacej nádobe a kryštalizačnej miske pri najvyššej koncentrácii na začiatku a na konci testu.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

42. Účelom tohto testu životného cyklu je stanoviť účinok testovanej chemikálie na rozmnožovanie a mieru vývinu a celkový počet úplne vykuklených a živých samčekov a samičiek pakomárov pre dve generácie. Na účely stanovenia pomeru vykuklenia sa údaje pre samčekov a samičky majú spojiť. Ak neexistujú žiadne štatisticky významné rozdiely medzi pohlaviami v citlivosti z hľadiska miery vývinu, výsledky pre samčekov a samičky možno na účely štatistickej analýzy spojiť.

43. Účinné koncentrácie vyjadrené ako koncentrácie v nadložnej vode (v prípade obohatenej vody) alebo sedimente (v prípade obohateného sedimentu) sa zvyčajne vypočítajú na základe nameraných koncentrácií na začiatku expozície (pozri bod 38). Preto sa v prípade obohatenej vody vypočíta priemer koncentrácií, ktoré sa zvyčajne merajú na začiatku expozície v nadložnej vode nádob pre obidve generácie a v kryštalizačných miskách, pre každú testovanú koncentráciu. V prípade obohateného sedimentu sa vypočíta priemer koncentrácií, ktoré sa zvyčajne merajú na začiatku expozície v nádobách pre obidve generácie (a voliteľne aj v kryštalizačných miskách), pre každú testovanú koncentráciu.

44. Na vypočítanie bodového odhadu, t. j. EC_x, sa ako pravé replikáty môžu použiť štatistické údaje na jednu nádobu alebo na jednu chovnú klietku. Pri výpočte intervalu spoľahlivosti pre každú hodnotu EC_x je potrebné zohľadniť variabilitu medzi nádobami alebo je nutné preukázať, že táto variabilita je taká malá, že ju možno ignorovať. Ak sa zodpovedajúci model vypočíta metódou najmenších štvorcov, v štatistike na jednu nádobu je potrebné aplikovať transformáciu, aby sa zlepšila homogenita rozptylu. Hodnoty EC_x by sa však mali vypočítať po tom ako sa reakcia transformuje naspäť na pôvodnú hodnotu (31).

▼M6

45. Ak je cieľom štatistickej analýzy určenie NOEC prostredníctvom testovania hypotézy, je potrebné zohľadniť variabilitu medzi nádobami, čo zaručuje použitie metód analýzy ANOVA (napr. postupmi Williamsovho testu a Dunnettovho testu). Williamsov test je vhodný v prípadoch, keď sa teoreticky očakáva monotónny priebeh krivky závislosti dávka-odpoveď a Dunnettov test je vhodný v prípadoch, keď sa hypotéza o monotónnosti nepotvrdí. Alternatívne môžu byť v prípadoch, keď sa nedodržia zvyčajné predpoklady analýzy ANOVA (31), vhodné robustnejšie testy (27).

Pomer vykuklenia

46. Pomery vykuklenia sú kvantové údaje a môžu sa analyzovať pomocou Cochranovho-Armitageho testu aplikovaného zostupne v prípadoch, keď sa očakáva monotónny priebeh krivky závislosti dávka-odpoveď a tieto údaje zodpovedajú tomuto očakávaniu. Ak to tak nie je, možno použiť Fisherov exaktný test alebo Mantzelov-Haentzalov test s Bonferroniho-Holmovou úpravou hodnôt p. Ak sa medzi replikátmi s rovnakou koncentráciou preukáže väčšia variabilita, než akej by nasvedčovala binomická distribúcia (často sa uvádza ako „extra-binomická“ variácia), potom by sa mal použiť robustný Cochranov-Armitageho test alebo Fisherov exaktný test ako sa navrhuje v bode (27).

Určí sa súčet živých pakomárov (samčekov plus samičiek) vykuklených na nádobu n_e a vydelí sa počtom pridaných lariev na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

kde:

ER = pomer vykuklenia,

n_e = počet živých pakomárov vykuklených na nádobu,

n_a = počet pridaných lariev na nádobu (zvyčajne 20).

Ak je hodnota n_e vyššia ako hodnota n_a (t. j. keď sa neúmyselne pridalo viac lariev ako plánovaný počet), mala by sa použiť hodnota n_a rovná n_e.

47. Najvhodnejším alternatívnym prístupom pri veľkých vzorkách v prípadoch extra-binomickej variácie je brať pomer vykuklenia ako spojitú reakciu a použiť postupy zodpovedajúce týmto údajom o *ER*. Za veľkú vzorku sa tu pokladá vzorka, v ktorej je počet vykuklených aj počet nevykuklených jedincov v každom replikáte (nádobe) vyšší ako päť.

48. Pri použití metód ANOVA je potrebné najskôr transformovať hodnoty *ER* pomocou arkussínusovej transformácie druhej odmocniny alebo Tukeyho-Freemanovej transformácie s cieľom získať približnú normálnu distribúciu a vyrovnať rozptyly. Cochranov-Armitageho test, Fisherov exaktný (Bonferroniho) test alebo Mantelov-Haentzalov test možno aplikovať ak sa použijú absolútne frekvencie. Arkussínusová transformácia druhej odmocniny sa aplikuje pomocou prevrátenej hodnoty sínusu ($\sin^{-1}$) druhej odmocniny *ER*.

49. Hodnoty EC_x pre pomery vykuklenia sa vypočítajú pomocou regresnej analýzy [napr. pomocou modelov probit, logit alebo Weibull (28)]. Ak je regresná analýza neúspešná (napr. ak sú menej ako dve čiastkové reakcie), možno použiť iné neparametrické metódy, napríklad metódu pohyblivého priemeru alebo jednoduchú interpoláciu.

Miera vývinu

50. Priemerný čas vývinu predstavuje priemerné časové rozpätie medzi pridaním lariev (0. deň testu) a vykuklením pokusnej kohorty pakomárov (pri výpočte reálneho času vývinu sa zohľadní vek lariev v čase pridania). Miera vývinu (jednotka: 1/deň) je prevrátená hodnota času vývinu a predstavuje časť vývinu lariev, ktorá prebehne za deň. Pri hodnotení týchto

▼**M6**

štúdií toxicity v sedimente sa uprednostňuje miera vývinu, lebo jej rozptyl je nižší a v porovnaní s časom vývinu je homogénnejší a bližší normálnej distribúcii. S mierou vývinu teda možno použiť výkonnejšie parametrické testovacie postupy ako s časom vývinu. Pre mieru vývinu ako spojitú reakciu možno hodnoty EC_x odhadnúť pomocou regresnej analýzy [napr. (29), (30)]. NOEC pre priemernú mieru vývinu možno stanoviť metódami ANOVA, napr. Williamsovým testom alebo Dunnettovým testom. Keďže samčekovia sa vykuklia skôr ako samičky, t. j. majú vyššiu mieru vývinu, je vhodné okrem hodnoty pre všetky pakomáre vypočítať mieru vývinu pre každé pohlavie oddelene.

51. Pri štatistických testoch sa predpokladá, že počet pakomárov pozorovaných v kontrolnom dni x sa vykuklil v priemernom časovom intervale medzi dňom x a dňom x – l (l = dĺžka kontrolného intervalu, zvyčajne jeden deň). Priemerná miera vývinu na nádobu ($\overline{x}$) sa vypočíta podľa tejto rovnice:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i X_i}{n_e}$$

kde:

$\overline{x}$: je priemerná miera vývinu na nádobu,

i: index kontrolného intervalu,

m: maximálny počet kontrolných intervalov,

f_i: počet pakomárov vykuklených v kontrolnom intervale i,

n_e: celkový počet pakomárov vykuklených na konci pokusu (= Σf_i)

x_i: miera vývinu pakomárov vykuklených v intervale i,

$$x_i = 1/\text{deň}_i - \frac{l_i}{2}$$

kde:

deň_i: kontrolný deň (počet dní od pridania lariev),

l_i: dĺžka kontrolného intervalu i (dni, zvyčajne jeden deň).

Pomer pohlaví

52. Pomery pohlaví sú kvantové údaje a preto by sa mali hodnotiť prostredníctvom Fisherovho exaktného testu alebo iných vhodných metód. Prirodzený pomer pohlaví *C. riparius* je jeden, t. j. samčekovia a samičky sú rovnako zastúpené. Pre obidve generácie sa údaje o pomere pohlaví majú spracovať rovnako. Keďže maximálny počet pakomárov na nádobu (t. j. 20) je príliš nízky na zmysluplné štatistické analýzy, vypočíta sa súčet

▼M6

celkového počtu úplne vykuklených a živých pakomárov pre každé pohlavie vo všetkých nádobách pre jednu testovanú koncentráciu chemikálie. Tieto netransformované údaje sa otestujú proti kontrolnej skupine (s rozpúšťadlom) alebo spojeným údajom z kontrolných skupín v kontingenčnej tabuľke 2 × 2.

Rozmnožovanie

53. Rozmnožovanie ako plodnosť sa vypočíta ako počet šnúr vajíčok na samičku. Konkrétnejšie, celkový počet šnúr vajíčok nakladených v chovnej klietke sa vydelí celkovým počtom živých a nepoškodených samičiek pridaných do tejto klietky. NOEC pre plodnosť možno stanoviť metódami ANOVA, napr. Williamsovým testom alebo Dunnettovým testom.

54. Fertilita šnúr vajíčok sa použije na kvantifikáciu počtu fertilných šnúr vajíčok na samičku. Celkový počet fertilných šnúr vajíčok nakladených v chovnej klietke sa vydelí celkovým počtom živých a nepoškodených samičiek pridaných do tejto klietky. NOEC pre fertilitu možno stanoviť metódami ANOVA, napr. Williamsovým testom alebo Dunnettovým testom.

Protokol o skúške

55. Protokol o skúške by mal obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti [rozpustnosť vo vode, tlak pary, log K_{ow}, rozdeľovacia konštanta v pôde (alebo v sedimente ak je k dispozícii), stabilita vo vode a v sedimente atď.],

— chemické identifikačné údaje (bežný názov, chemický názov, štruktúrálny vzorec, číslo CAS atď.) vrátane čistoty a analytickej metódy kvantifikácie testovanej chemikálie.

Testovacie druhy:

— použité testovacie organizmy: druh, vedecký názov, zdroj organizmov a podmienky chovu,

— informácie o manipulácii s vaječnou hmotou a larvami,

— informácie o manipulácii s vykuklenými dospelými jedincami 1. generácie s použitím exhaustora atď. (pozri dodatok 5),

— vek testovacích organizmov 1. a 2. generácie v čase vloženia do testovacích nádob.

Podmienky testu:

— použitý sediment, t. j. prírodný alebo umelo pripravený (umelý) sediment,

— prírodný sediment: poloha a opis miesta odobratia vzoriek sedimentu vrátane histórie kontaminácie ak je to možné, charakteristiky sedimentu: pH, obsah organického uhlíka, pomer C/N a granulometria (podľa potreby),

— umelo pripravený sediment: príprava, zložky a charakteristiky (obsah organického uhlíka, pH, vlhkosť atď. odmerané na začiatku testu),

— príprava vody použitej na testovanie (ak sa použije rekonštituovaná voda) a charakteristiky (koncentrácia kyslíka, pH, tvrdosť atď. odmerané na začiatku testu),

▼**M6**

— hĺbka sedimentu a nadložnej vody v testovacích nádobách a kryštalizačných miskách,

— objem nadložnej vody a vody nachádzajúcej sa v póroch sedimentu, hmotnosť mokrého sedimentu s vodou nachádzajúcou sa v póroch sedimentu a bez nej pre testovacie nádoby a kryštalizačné misky,

— testovacie nádoby (materiál a veľkosť),

— kryštalizačné misky (materiál a veľkosť),

— chovné klietky (materiál a veľkosť),

— metóda prípravy zásobných roztokov a testovacie koncentrácie pre testovacie nádoby a kryštalizačné misky,

— aplikácia testovanej chemikálie do testovacích nádob a kryštalizačných misiek: testované koncentrácie, počet replikátov a prípadné rozpúšťadlá ak sú potrebné,

— inkubačné podmienky v testovacích nádobách: teplota, cyklus a intenzita svetla, prevzdušňovanie (počet bubliniek za sekundu),

— inkubačné podmienky v chovných klietkach a kryštalizačných miskách: teplota, cyklus a intenzita svetla,

— inkubačné podmienky pre šnúry vajíčok na mikrotitračných platniach (alebo iných nádobách): teplota, cyklus a intenzita svetla,

— podrobné informácie o kŕmení vrátane druhu potravy, prípravy, množstva a kŕmneho režimu.

Výsledky:

— nominálne testované koncentrácie, namerané testované koncentrácie a výsledky všetkých analýz na stanovenie koncentrácie testovanej chemikálie v testovacích nádobách a kryštalizačných miskách,

— kvalita vody v testovacích nádobách a kryštalizačných miskách, t. j. pH, teplota, rozpustený kyslík, tvrdosť a amoniak,

— doplnenie prípadnej vyparenej vody použitej na testovanie v testovacích nádobách,

— počet vykuklených samčích a samičích pakomárov na nádobu na deň pre 1. a 2. generáciu,

— pomer pohlaví úplne vykuklených a živých pakomárov na testovanú koncentráciu pre 1. a 2. generáciu,

— počet lariev na nádobu, ktoré sa nevykuklili ako pakomáre, pre 1. a 2. generáciu,

— percento/podiel vykuklených jedincov na replikát a testovanú koncentráciu (samičky a samčekovia pakomárov spolu) pre 1. a 2. generáciu,

— priemerná miera vývinu úplne vykuklených a živých pakomárov na replikát a testovanú koncentráciu (samičky a samčekovia pakomárov samostatne i spolu) pre 1. a 2. generáciu,

— počet šnúr vajíčok uložených v kryštalizačných miskách na chovnú klietku a deň,

▼**M6**

— vlastnosti každej šnúry vajíčok (veľkosť, tvar a fertilita),

— plodnosť – celkový počet šnúr vajíčok na celkový počet samičiek pridaných do chovnej klietky,

— fertilita – celkový počet fertilných šnúr vajíčok na celkový počet samičiek pridaných do chovnej klietky,

— odhady sledovaných parametrov toxicity, napr. EC_x (a súvisiace intervaly spoľahlivosti), NOEC a štatistické metódy použité na jej stanovenie,

— rozbor výsledkov vrátane každého vplyvu na výsledok testu vyplývajúceho z odchýlok od tejto testovacej metódy.

LITERATÚRA

1. Kapitola C.28 tejto prílohy, Sediment-water chironomid toxicity test using spiked water.

2. Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. a 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, Spojené kráľovstvo.

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. a 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. a 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. a 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. Kapitola C.27 tejto prílohy, Sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment.

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, Paríž.

17. Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. a 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. a 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. a J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem., 13: 1163 – 1175.

21. Naylor, C. a 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. a 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. a 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. a D.J. Versteeg (1992) a statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environ. Toxicol. Chem., 11: 1485 – 1494.

30. Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66: 298 – 312.

31. OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, s. 146, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paríž.

32. Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. a 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. a 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, Paríž.

▼**M6**

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov

Na účely tejto testovacej metódy sa používajú tieto vymedzenia pojmov:

Chemikália je látka alebo zmes.

Umelo pripravený sediment alebo rekonštituovaný, umelý alebo syntetický sediment je zmes materiálov použitých na napodobnenie fyzických zložiek prírodného sedimentu.

Nadložná voda je voda umiestnená v testovacej nádobe nad sedimentom.

Intersticiálna voda alebo voda nachádzajúca sa v póroch sedimentu je voda nachádzajúca sa v priestore medzi časticami sedimentu a pôdy.

Obohatená voda je voda použitá na testovanie, do ktorej bola pridaná testovaná chemikália.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

▼M6

Dodatok 2

Odporúčania na kultiváciu *Chironomus riparius*

1. Larvy *Chironomus* sa môžu chovať v kryštalizačných miskách alebo vo väčších nádobách. Na dno nádoby sa nanesie tenká vrstva jemného kremenného piesku vo výške 5 – 10 mm. Je preukázané, že vhodným substrátom je aj diatomit (napr. Merck, položka 8117) (postačuje tenšia vrstva do výšky len niekoľkých milimetrov). Potom sa pridá vhodná voda do výšky niekoľkých centimetrov. Hladina vody by sa mala podľa potreby dolievať, aby sa doplnila strata vyparením a aby sa predišlo vysychaniu. Vodu je možné v prípade potreby vymeniť. Je potrebné zabezpečiť jemné prevzdušňovanie. Nádoby na chov lariev by mali byť umiestnené vo vhodnej klietke, ktorá zabráni úniku vykuklených dospelých jedincov. Klietka by mala byť dostatočne veľká, aby umožňovala rojenie vykuklených dospelých jedincov, v opačnom prípade by nemuselo dôjsť ku kopulácii (minimálna veľkosť je približne 30 × 30 × 30 cm).

2. Klietky je potrebné udržiavať pri izbovej teplote alebo v miestnosti so stálym prostredím pri teplote 20 ± 2 °C s fotoperiódou 16 hodín svetla (intenzita približne 1 000 luxov) a 8 hodín tmy. Uvádza sa, že vlhkosť vzduchu nižšia ako 60 % RH môže brániť rozmnožovaniu.

Riediaca voda

3. Možno použiť akúkoľvek vhodnú prírodnú alebo syntetickú vodu. Bežne sa používa studňová voda, odchlórovaná voda z vodovodu a umelé médiá (napr. Elendtovo médium „M4“ alebo „M7“, pozri ďalej). Pred použitím je potrebné vodu prevzdušniť. V prípade potreby možno kultivačnú vodu obnoviť opatrným odliatím alebo odčerpaním použitej vody z kultivačných nádob bez toho, aby sa poškodili trubice lariev.

Kŕmenie lariev

4. Larvy rodu *Chironomus* sa kŕmia vločkovým krmivom pre ryby (Tetra-Min®, TetraPhyll® alebo inou podobnou chránenou značkou krmiva pre ryby) v približnom množstve 250 mg na nádobu na deň. Krmivo sa môže podávať ako suchý rozomletý prášok alebo ako suspenzia vo vode: 1,0 g vločkového krmiva sa pridá do 20 ml riediacej vody a premieša sa, aby sa získala homogénna zmes. Tento prípravok sa môže podávať v množstve približne 5 ml na nádobu na deň (pred použitím pretrepať). Staršie larvy môžu dostávať viac.

5. Kŕmenie sa upraví podľa kvality vody. Ak sa kultivačné médium zakalí, kŕmenie je potrebné obmedziť. Prídavky do krmiva je potrebné starostlivo monitorovať. Nedostatok potravy spôsobí, že larvy sa budú presúvať k vodnému stĺpcu a prebytok potravy spôsobí zvýšenie činnosti mikróbov a zníženie koncentrácie kyslíka. V obidvoch prípadoch môže dôjsť k zníženiu rýchlosti rastu.

6. Pri založení nových kultivačných nádob sa môžu pridať aj bunky niektorých zelených rias (napr. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

Kŕmenie vykuklených dospelých jedincov

7. Z niektorých pokusov vyplýva, že ako potrava pre vykuklené dospelé jedince môže slúžiť vatový tampón napustený nasýteným sacharózovým roztokom.

▼M6

Vykuklenie

8. Pri teplote 20 ± 2 °C sa dospelé jedince začnú vykuklovať z nádob na chov lariev po približne 13 – 15 dňoch. Samčekovia sa ľahko rozpoznajú podľa obrvených tykadiel a tenkého tela.

Vaječné hmoty

9. Keď sú v chovnej klietke prítomné dospelé jedince, vo všetkých nádobách na chov lariev je potrebné trikrát do týždňa kontrolovať kladenie želatínových vaječných hmôt. Ak sú vaječné hmoty prítomné, opatrne sa odoberú. Mali by sa preniesť na malú misku so vzorkou kultivačnej vody. Vaječné hmoty sa použijú na založenie nových kultivačných nádob (napr. dve až štyri vaječné hmoty na nádobu) alebo sa použijú v testoch toxicity.

10. Larvy prvého instaru by sa mali vyliahnuť po dvoch až troch dňoch.

Založenie nových kultivačných nádob

11. Po vytvorení kultúr by malo byť možné založiť novú nádobu na kultiváciu lariev každý týždeň alebo menej často v závislosti od testovacích požiadaviek, pričom staršie nádoby sa po vykuklení dospelých pakomárov odstránia. Týmto spôsobom sa pri minimálnom riadení zabezpečí pravidelné doplňanie dospelých jedincov.

Príprava testovacích roztokov „M4“ a „M7“

12. Elendt (1990) opísal médium „M4“. Médium „M7“ sa pripravuje ako médium „M4“ s výnimkou látok uvedených v tabuľke 1, ktorých koncentrácie v médiu „M7“ sú štyrikrát nižšie ako v médiu „M4“. Testovací roztok by sa nemal pripraviť podľa Elendta a Biasa (1990), lebo uvedené koncentrácie $NaSiO_3$, $5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 a K_2HPO_4 na prípravu zásobných roztokov nie sú vhodné.

Príprava média „M7“

13. Každý zásobný roztok (I) sa pripraví jednotlivo a kombinovaný zásobný roztok (II) sa pripraví z týchto zásobných roztokov (I) (pozri tabuľku 1). Na prípravu média „M7“ sa 50 ml z kombinovaného zásobného roztoku (II) a množstvá každého makronutričného zásobného roztoku uvedené v tabuľke 2 doplnia do 1 litra deionizovanej vody. Vitamínový zásobný roztok sa pripraví pridaním troch vitamínov do deionizovanej vody, ako je uvedené v tabuľke 3 a krátko pred použitím sa do konečného média „M7“ pridá 0,1 ml kombinovaného vitamínového zásobného roztoku. Vitamínový zásobný roztok sa skladuje zmrazený v malých alikvotných častiach. Médium sa prevzdušňuje a stabilizuje.

Tabuľka 1

Zásobné roztoky stopových prvkov pre médiá M4 a M7

Zásobné roztoky (I)	Množstvo (mg) doplnené do 1 litra deionizovanej vody	Príprava kombinovaného zásobného roztoku (II): zmiešajte tieto množstvá (ml) zásobných roztokov (I) a doplňte do 1 litra deionizovanej vody		Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch (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**

Zásobné roztoky (I)	Množstvo (mg) doplnené do 1 litra deionizovanej vody	Príprava kombinovaného zásobného roztoku (II): zmiešajte tieto množstvá (ml) zásobných roztokov (I) a doplňte do 1 litra deionizovanej vody		Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch (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
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Tieto látky sa líšia medzi médiami M4 a M7, ako je uvedené vyššie.
(2) Tieto roztoky sa pripravia jednotlivo, potom sa zlejú dokopy a okamžite sa autoklávujú.

Tabuľka 2

Makronutričné zásobné roztoky pre médiá M4 a M7

	Množstvo doplnené do 1 litra deionizovanej vody (mg)	Množstvo pridaných makronutričných zásobných roztokov pri príprave médií M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch M4 a 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**

Tabuľka 3

Vitamínový zásobný roztok pre médiá M4 a M7

Všetky tri vitamínové roztoky sa skombinujú, aby sa vytvoril jeden vitamínový zásobný roztok.

	Množstvo doplnené do 1 litra deionizovanej vody (mg)	Množstvo pridaného vitamínového zásobného roztoku pri príprave médií M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch M4 a M7 (mg/l)
Tiamín hydrochlorid	750	0,1	0,075
Kyanokobalamín (B12)	10	0,1	0,0010
Biotín	7,5	0,1	0,00075

LITERATÚRA

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streloke a H. Köpp. Berlin.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, Protoplasma, 154: 25 – 33.

Elendt, B.P. a 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

Dodatok 3

Príprava umelo pripraveného sedimentu

ZLOŽENIE SEDIMENTU

Zloženie umelo pripraveného sedimentu by malo byť takéto:

Zložka	Charakteristika	% suchej hmotnosti sedimentu
Rašelina	Rašelinníková rašelina, pH čo najbližšie k 5,5 – 6,0, bez viditeľných zvyškov rastlín, jemne rozomletá (veľkosť častíc ≤ 1 mm) a vysušená vzduchom	4 – 5
Kremenný piesok	Veľkosť zrniek: > 50 % častíc by malo mať veľkosť v rozsahu 50 – 200 μm	75 – 76
Kaolín	Obsah kaolinitu ≥ 30 %	20
Organický uhlík	Upravený pridaním rašeliny a piesku	2 (± 0,5)
Uhličitan vápenatý	$CaCO_3$, rozomletý na prach, chemicky čistý	0,05 – 0,1
Voda	Vodivosť ≤ 10 μS/cm	30 – 50

PRÍPRAVA

Rašelina sa usuší vzduchom a rozomelie na jemný prášok. V deionizovanej vode sa pomocou vysokovýkonného homogenizačného prístroja pripraví suspenzia požadovaného množstva rašelinového prášku. Hodnota pH tejto suspenzie sa upraví na 5,5 ± 0,5 pomocou $CaCO_3$. Suspenzia sa aspoň na dva dni uvedie do podmienok jemným premiešavaním pri teplote 20 ± 2 °C, aby sa stabilizovala hodnota pH a vytvorila stabilná mikrobiálna zložka. Opäť sa zmeria pH, ktoré by malo byť na úrovni 6,0 ± 0,5. Rašelinová suspenzia sa následne zmieša s ostatnými zložkami (pieskom a kaolínom) a s deionizovanou vodou, aby sa získal homogénny sediment s obsahom vody v rozsahu 30 – 50 % suchej hmotnosti sedimentu. Znova sa zmeria pH konečnej zmesi a podľa potreby sa pomocou $CaCO_3$ upraví na 6,5 – 7,5. Odoberú sa vzorky sedimentu, aby sa určila suchá hmotnosť a obsah organického uhlíka. Potom sa odporúča, aby sa pred použitím v teste toxicity pri pakomároch umelo pripravený sediment uviedol na sedem dní do rovnakých podmienok aké budú prevládať v nasledujúcom teste.

SKLADOVANIE

Suché zložky na prípravu umelého sedimentu sa môžu skladovať na suchom a chladnom mieste pri izbovej teplote. Umelo pripravený (mokrý) sediment by sa pred použitím v teste nemal skladovať. Mal by sa použiť ihneď po sedemdňovom období uvádzania do podmienok, ktorým sa končí jeho príprava.

LITERATÚRA

OECD (1984), Earthworm acute Toxicity Test, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paríž.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. a 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**

Dodatok 4

Chemické charakteristiky prijateľnej riediacej vody

ZLOŽKA	KONCENTRÁCIE
Tuhé častice	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Tvrdosť ako $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Zostatkový chlór	< 10 µg/l
Celkové organofosfátové pesticídy	< 50 ng/l
Celkové organochlórové pesticídy a polychlórované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlór	< 25 ng/l

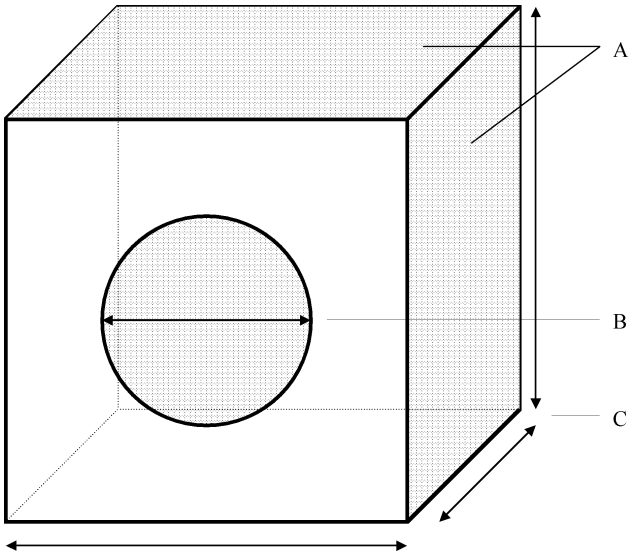
(*) Treba však poznamenať, že ak existuje podozrenie na interakciu medzi iónmi tvrdosti a testovanou chemikáliou, mala by sa použiť voda s nižšou tvrdosťou (a v takom prípade sa teda nemá použiť Elendtovo médium M4).

▼**M6**

Dodatok 5

Usmernenia na vykonanie testu

Príklad chovnej klietky:



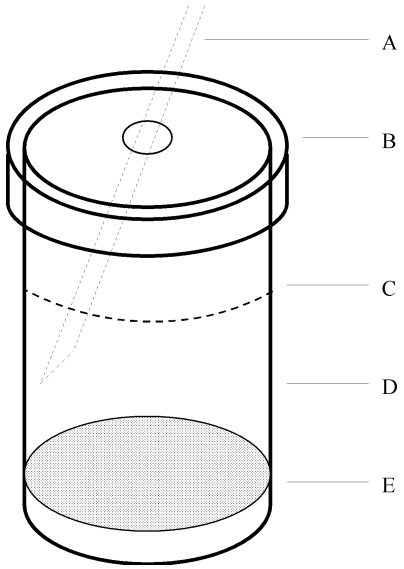
A: gáza na vrchu a aspoň na jednej strane klietky (veľkosť ôk približne 1 mm)

B: otvor na umiestnenie vykuklených dospelých jedincov do chovnej klietky a na odstránenie nakladených šnúr vajíčok z kryštalizačných misiek (nie sú zobrazené na tomto obrázku)

C: minimálna veľkosť chovnej klietky – dĺžka 30 cm, výška 30 cm, šírka 30 cm

▼**M6**

Príklad testovacej nádoby:



A: Pasteurova pipeta na prívod vzduchu do nadložnej vody

B: sklenené veko na zabránenie úniku vykuklených pakomárov

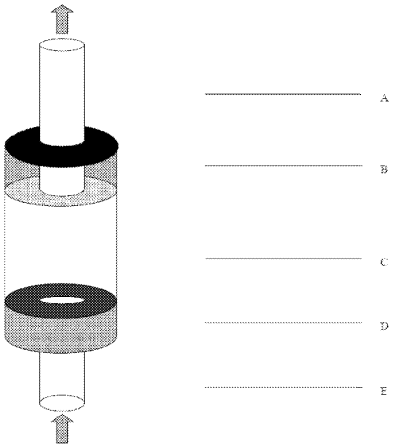
C: úroveň hladiny vody

D: testovacia nádoba (sklenená kadička s objemom minimálne 600 ml)

E: vrstva sedimentu

▼**M6**

Príklad exhaustora na zachytenie dospelých pakomárov (šípky označujú smer prúdenia vzduchu):



A: sklenená trubička (vnútorný priemer približne 5 mm) pripojená k samonasávaciemu čerpadlu

B: zátka z vulkanizovaného kaučuku perforovaná sklenenou trubičkou (A). Na vnútornej strane je otvor sklenenej trubičky (A) pokrytý bavlnou a gázou (veľkosť ôk približne 1 mm), aby sa pakomáre nasávané do exhaustora nepoškodili.

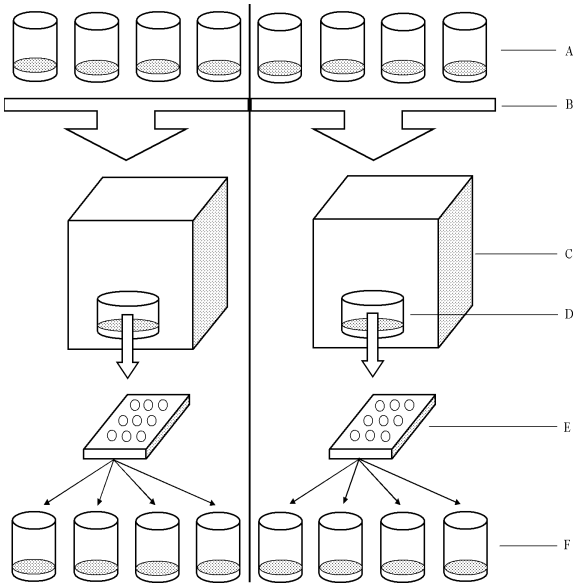
C: priehľadná nádoba (plastová alebo sklenená, dĺžka približne 15 cm) na chytené pakomáre

D: zátka z vulkanizovaného kaučuku perforovaná trubičkou (E). Na účely vypustenia pakomárov do chovnej klietky sa zátka D uvoľní z nádoby C.

E: trubička (plastová alebo sklenená, vnútorný priemer približne 8 mm) na zbieranie dospelých pakomárov z nádoby

▼**M6**

Schematické zobrazenie testu životného cyklu:



A: 1. generácia – testovacie nádoby obsahujúce systém sediment – voda, osem replikátov, 20 lariev v prvom instare na nádobu

B: štyri testovacie nádoby na každú chovnú klietku a a B

C: chovné klietky (A a B) na rojenie, párenie a kladenie vajíčok

D: kryštalizačné misky na kladenie šnúr vajíčok

E: mikrotitračné platne, jedna jamka pre každú šnúru vajíčok

F: 2. generácia – testovacie nádoby obsahujúce systém sediment – voda, osem replikátov, 20 lariev v prvom instare na nádobu.

▼M6

C.41. TEST POHLAVNÉHO VÝVINU RÝB

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 234 (2011). Je založená na rozhodnutí z roku 1998 vypracovať nové alebo aktualizovať existujúce testovacie metódy na skríning a testovanie potenciálnych endokrinných disruptorov. Test pohlavného vývinu rýb (FSDT) bol identifikovaný ako sľubná testovacia metóda zahŕňajúca citlivé vývinové štádium rýb reagujúce na chemikálie podobné estrogénu a androgénu. Testovacia metóda prešla medzilaboratórnou validáciou od roku 2006 do roku 2010, v ktorej medaka japonská (*Oryzias latipes*), dánio pruhované (*Danio rerio*) a pichľavka sivá (*Gasterosteus aculeatus*) boli validované a čerebľa potočná (*Pimephales promelas*) bola validovaná čiastočne (41) (42) (43). Tento protokol zahŕňa medaku japonskú, pichľavku sivú a dánio pruhované. Protokol je v zásade rozšírením usmernenia OECD TG 210 na test toxicity v ranom štádiu života rýb (1), v ktorom expozícia pokračuje, kým ryby nedosiahnu pohlavnú diferenciáciu, t. j. približne 60 dní po vyliahnutí (dph) pre medaku japonskú, pichľavku sivú a dánio pruhované (v prípade iných druhov, ktoré budú validované v budúcnosti, sa obdobie expozície môže skrátiť alebo predĺžiť) a boli pridané sledované parametre endokrinnej citlivosti. Testom FSDT sa vyhodnocujú účinky a potenciálne nepriaznivé dôsledky údajných endokrinných disruptorov (napr. estrogénov androgénov a inhibítorov steroidogenézy) na pohlavný vývin v skorých štádiách života. Kombinácia dvoch hlavných endokrinných sledovaných parametrov, teda koncentrácie vitellogenínu (VTG) a fenotypového pomeru pohlaví, umožňuje na základe testu stanoviť spôsob pôsobenia testovanej chemikálie. Vzhľadom na zmenu fenotypového pomeru pohlaví významného pre celú populáciu možno test FSDT použiť na posúdenie nebezpečenstva a rizika. Ak sa však test použije na posúdenie nebezpečenstva alebo rizika, pichľavka sivá by sa nemala používať, lebo z doteraz získaných validačných údajov vyplýva, že pri tomto druhu nie sú zmeny fenotypového pomeru pohlaví v dôsledku testovanej chemikálie časté.

2. Protokol je založený na expozícii rýb chemikáliám vo vode počas obdobia citlivého na pohlavný vývin, v ktorom sa očakáva, že ryby budú najcitlivejšie na účinky endokrinných disruptorov, ktoré majú vplyv na pohlavný vývin. Ako ukazovatele vývinových odchýlok súvisiacich s endokrinnou činnosťou sa merajú dva hlavné sledované parametre: koncentrácie VTG a pomery pohlaví (podiely jednotlivých pohlaví), ktoré sa stanovujú histologickým vyšetrením gonád. Histopatologické vyšetrenie gonád (hodnotenie oocytov a spermatogénnych buniek a stanovenie ich štádia) je voliteľné. Ak to je možné, stanoví sa aj genetické pohlavie (napr. pri medake japonskej a pichľavke sivej). Prítomnosť genetického markera pohlavia je značnou výhodou, lebo zvyšuje spoľahlivosť štatistiky pomeru pohlaví a umožňuje zistiť jednotlivé prípady fenotypovej zmeny pohlavia. Medzi ďalšie vrcholové sledované parametre, ktoré by sa mali merať, patrí miera liahnutia, prežívanie, dĺžka a telesná hmotnosť. Testovaciu metódu možno prispôsobiť aj iným druhom ako tie, ktoré sú uvedené vyššie, za predpokladu, že tieto druhy prejdú validáciou rovnocennou validácii vykonanej pre medaku japonskú, pichľavku sivú a dánio pruhované, že kontrolné ryby sú na konci testu pohlavne diferencované, že hladiny VTG sú dostatočne vysoké na to, aby sa odhalili výrazné odchýlky súvisiace s chemikáliami a že citlivosť testovacieho systému sa stanoví pomocou referenčných chemikálií s endokrinným pôsobením [(anti)-estrogény, (anti)-androgény, inhibítory aromatázy atď.]. Všetky validačné správy obsahujúce údaje z testu FSDT s použitím iných druhov by navyše mala preskúmať organizácia OECD, pričom výsledok validácie by sa mal považovať za uspokojivý.

▼M6

Úvodné úvahy a obmedzenia

3. VTG sa normálne tvorí v pečeni samičiek oviparných stavovcov v reakcii na endogénny estrogén v krvnom obehu (2). Je prekurzorom proteínov vajcového žĺtka a po vytvorení v pečeni sa krvným obehom dostane do vaječníka, kde ho prijmú a upravia vyvíjajúce sa vajíčka. Pri nedospelých rybách a dospelých samčekoch rýb je syntéza VTG veľmi obmedzená, ale zistiteľná, lebo nemajú dostatok estrogénu v krvnom obehu. Pečeň je však schopná syntetizovať a vylučovať VTG v reakcii na exogénnu estrogénovú stimuláciu (3) (4) (5).

4. Meranie VTG slúži na zistenie chemikálií s estrogénnym anti-estrogénnym a androgénnym spôsobom účinku a chemikálií, ktoré narúšajú steroidogenézu ako sú napríklad inhibítory aromatázy. Estrogénne chemikálie možno zistiť meraním indukcie tvorby VTG pri samčekoch rýb, čo je v partnersky preskúmanej vedeckej literatúre dostatočne zdokumentované. Indukcia tvorby VTG sa preukázala aj po expozícii aromatizovateľným androgénom (6) (7). Zníženie hladiny estrogénu v krvnom obehu pri samičkách, napríklad prostredníctvom inhibície aromatázy, ktorá konvertuje endogénny androgén na prirodzený estrogén 17β-estradiol, spôsobuje pokles koncentrácie VTG, čo sa používa na zisťovanie chemikálií s vlastnosťami inhibujúcimi aromatázu alebo inhibítorov steroidogenézy vo všeobecnosti (33). Biologický význam reakcie VTG po estrogénnej inhibícii aromatázy je známy a dobre zdokumentovaný (8) (9). Je však možné, že tvorbu VTG pri samičkách môže ovplyvniť aj všeobecná toxicita a neendokrinné spôsoby toxického pôsobenia.

5. Viaceré metódy merania boli úspešne vyvinuté a štandardizované na bežné použitie na kvantifikáciu VTG vo vzorkách krvi, pečene, celého tela alebo homogenátu hlavy/chvosta odobratých z jednotlivých rýb. Týka sa to dánia pruhovaného, pichľavky sivej a medaky japonskej ako aj čiastočne validovaného druhu čerebľa potočná. Sú dostupné metódy enzýmového imunosorbentového stanovenia (ELISA) špecifické pre jednotlivé druhy využívajúce imunochémiu na kvantifikáciu VTG (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). V prípade medaky japonskej a dánia pruhovaného existuje dobrá korelácia medzi nameranou hodnotou VTG vo vzorkách krvnej plazmy, pečene a homogenátu, hoci homogenáty mávajú mierne nižšie hodnoty ako plazma (17) (18) (19). Dodatok 5 obsahuje odporúčané postupy na odber vzoriek na analýzu VTG.

6. Zmena vo fenotypovom pomere pohlaví (podiely pohlaví) je sledovaný parameter, ktorý odzrkadľuje zmenu pohlavia. Pomer pohlaví pri vyvíjajúcich sa rybách môžu v zásade ovplyvniť estrogény anti-estrogény androgény anti-androgény a chemikálie inhibujúce steroidogenézu (20). Preukázalo sa, že táto zmena pohlavia je čiastočne reverzibilné pri dániu pruhovanom (21) po expozícii chemikáliám podobným estrogénu, kým zmena pohlavia po expozícii chemikáliám podobným androgénu je trvalá (30). Pohlavie je definované ako samičie, samčie, intersexuálne (oocyty ako aj spermatogénne bunky v jednej gonáde) alebo nediferencované, pričom pri jednotlivých rybách sa stanovuje histologickým vyšetrením gonád. Usmernenie je uvedené v dodatku 7 a v usmerňovacom dokumente OECD na diagnózu endokrinnej histopatológie gonád rýb (22).

7. Genetické pohlavie sa skúma prostredníctvom genetických markerov ak v danom druhu rýb existujú. V prípade medaky japonskej možno samičie gény XX alebo samčie gény XY zistiť polymerázovou reťazovou reakciou (PCR), prípadne možno analyzovať gén domény DM spojený s chromozómom Y (DMY, negatívny alebo pozitívny) podľa opisu v odkazoch (23)

▼M6

(24). V prípade pichľavky sivej existuje rovnocenná metóda PCR na stanovenie genetického pohlavia, ktorá je opísaná v dodatku 10. Spoľahlivosť tohto testu sa zlepší ak genetické pohlavie možno individuálne spojiť s fenotypovým pohlavím, takže pri druhoch so zdokumentovanými genetickými pohlavnými markermi by sa malo určiť genetické pohlavie.

8. Dva hlavné endokrinné sledované parametre, teda VTG a pomer pohlaví, môžu v kombinácii preukázať endokrinný spôsob pôsobenia (MOA) chemikálie (tabuľka 1). Pomer pohlaví je biomarker významný pre celú populáciu (25) (26) a pri niektorých dobre vymedzených spôsoboch pôsobenia možno výsledky testu FSDT použiť na účely posúdenia nebezpečenstva a rizika ak to regulačná agentúra považuje za vhodné. Tieto spôsoby pôsobenia sú v súčasnosti estrogény androgény a inhibítory steroidogenézy.

Tabuľka 1

Reakcia endokrinných sledovaných parametrov na rôzne spôsoby pôsobenia chemikálií:

↑ = zvyšovanie, ↓ = znižovanie, — = neskúmalo sa

MOA	VTG ♂	VTG ♀	Pomer pohlaví	ODKAZY
Slabý agonista estrogénu	↑	↑	↑♀ alebo ↑ nedif.	(27) (40)
Silný agonista estrogénu	↑	↑	↑♀ alebo ↑ nedif., žiadne ♂	(28) (40)
Antagonista estrogénu	—	—	↓♀, ↑ nedif.	(29)
Agonista androgénu	↓ alebo —	↓ alebo –	↑ ♂, žiadne ♀	(28) (30)
Antagonista androgénu	—	—	↑♀ ↑ intersex.	(31)
Inhibítor aromatázy	↓	↓	↓♀	(33)

9. Test FSDT sa nevzťahuje na reprodukčné štádium života rýb, takže chemikálie, ktoré môžu ovplyvniť rozmnožovanie pri nižšej koncentrácii ako pohlavný vývin, by sa mali preskúmať v teste, ktorý sa týka rozmnožovania.

10. Vymedzenie pojmov na účely tejto testovacej metódy je uvedené v dodatku 1.

11. Test FSDT *in vivo* je určený na zistenie chemikálií s androgénnymi a estrogénnymi vlastnosťami ako aj s anti-androgénnymi anti-estrogénnymi vlastnosťami a vlastnosťami inhibujúcimi steroidogenézu. Fázy validácie testu FSDT (1 a 2) zahŕňali estrogénne a androgénne chemikálie a chemikálie inhibujúce steroidogenézu. Účinky antagonistov estrogénu a androgénu v teste FSDT sú uvedené v tabuľke 1, ale tieto endokrinné spôsoby pôsobenia (MOA) sú v súčasnosti menej zdokumentované.

PRINCÍP TESTU

12. Pri teste sa štádiá rýb od čerstvo oplodnených vajíčok až po skončenie pohlavnej diferenciácie exponujú aspoň trom koncentráciám testovanej chemikálie rozpustenej vo vode. Podmienky testu by mali byť prietokové, pokiaľ to nie je nemožné vzhľadom na dostupnosť alebo povahu (napr. obmedzenú rozpustnosť) testovanej chemikálie. Test sa začína umiestnením čerstvo oplodnených vajíčok (pred ryhovaním blastodisku) do skúšobných komôr. Plnenie komôr je pre jednotlivé druhy opísané v bode 27. V prípade validovaných druhov rýb, teda medaky japonskej, pichľavky sivej a dánia

▼M6

pruhovaného, sa test ukončí pri 60 dph. Po ukončení testu sa všetky ryby humánnym spôsobom usmrtia. Z každej ryby sa odoberie biologická vzorka (krvná plazma, pečeň alebo homogenát hlavy/chvosta) na analýzu VTG a zvyšná časť sa zafixuje na účely histologického vyšetrenia gonád na určenie fenotypového pohlavia. Voliteľne možno vykonať histopatologické vyšetrenie (napr. stanovenie štádia gonád, závažnosti intersexuálnej formy). V prípade druhov s príslušnými markermi sa odoberie biologická vzorka (z análnej alebo chrbtovej plutvy) na stanovenie genetického pohlavia (dodatky 9 a 10).

13. Prehľad príslušných podmienok testu špecifických pre validované druhy medaka japonská, pichľavka sivá a dánio pruhované je uvedený v dodatku 2.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

14. Mali by byť k dispozícii výsledky testu akútnej toxicity alebo inej skúšky krátkodobej toxicity [napr. testovacej metódy C.14 (34) a OECD TG 210 (1)], vykonanej podľa možnosti s druhmi zvolenými na tento test. To znamená, že má byť známa rozpustnosť vo vode a tlak pary testovanej chemikálie a že je dostupná spoľahlivá analytická metóda na kvantifikáciu chemikálie v skúšobných komorách so známou a zdokumentovanou presnosťou a detekčným limitom.

15. Medzi ďalšie užitočné informácie patrí štruktúrny vzorec, čistota chemikálie, stabilita vo vode a na svetle, pKa, P_{ow} a výsledky testu na ľahkú biodegradovateľnosť (testovacia metóda C.4) (35).

Kritériá prijateľnosti testu

16. Na to, aby boli výsledky testu prijateľné, musia platiť tieto podmienky:

— koncentrácia rozpusteného kyslíka musí byť počas testu aspoň 60 % z rozpustnosti vzdušného kyslíka (ASV),

— teplota vody by sa v danom čase počas obdobia expozície nemala medzi skúšobnými komorami líšiť o viac ako ± 1,5 °C a musí sa udržiavať v teplotných rozsahoch vymedzených pre testovací druh (dodatok 2),

— mala by byť k dispozícii validovaná metóda na analýzu expozície chemikálii s detekčným limitom podstatne nižším ako najnižšia nominálna koncentrácia a mali by sa zhromaždiť dôkazy preukazujúce, že koncentrácie testovanej chemikálie v roztoku sa uspokojivo udržiavali v rozsahu ± 20 % priemerných nameraných hodnôt,

— počet všetkých oplodnených vajíčok, ktoré prežili v kontrolných skupinách, prípadne v kontrolných skupinách s rozpúšťadlom, musí byť väčší alebo rovnaký ako limity stanovené v dodatku 2,

— kritériá prijateľnosti týkajúce sa rastu a podielov pohlaví na konci testu sú založené na údajoch z kontrolných skupín (zo spojenej kontrolnej skupiny s rozpúšťadlom a vodou, pokiaľ sa výrazne nelíšia, tak len zo skupiny s rozpúšťadlom):

▼M6

		Medaka japonská	Dánio pruhované	Pichľavka sivá
Rast	Mokrá hmotnosť ryby vytretej do sucha	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Dĺžka (štandardná dĺžka)	> 20 mm	> 14 mm	> 20 mm
Pomer pohlaví (% samčekov alebo samičiek)		30 – 70 %	30 – 70 %	30 – 70 %

— ak sa použije rozpúšťadlo, nemalo by mať žiadny štatisticky významný účinok na prežívanie a nemalo by mať žiadne účinky narušujúce endokrinný systém ani iné nepriaznivé účinky na skoré štádiá života zistené analýzou kontrolnej skupiny pre rozpúšťadlo.

Ak sa zistí odchýlka od kritérií prijateľnosti testu, dôsledky by sa mali posudzovať s ohľadom na spoľahlivosť testovacích údajov a tieto úvahy by mali byť zahrnuté do správy.

OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Skúšobné komory

17. Možno použiť akékoľvek komory zo skla, nehrdzavejúcej ocele alebo iné chemicky inertné komory. Rozmery komôr by mali byť dostatočne veľké, aby zodpovedali kritériám pre stupeň zaťaženia uvedeným ďalej. Je potrebné umiestniť skúšobné komory náhodne na testovacej ploche. Náhodný blokový dizajn, v ktorom sa každá koncentrácia nachádza v každom bloku, sa uprednostňuje pred úplne náhodným dizajnom. Skúšobné komory by sa mali chrániť pred nežiaducimi narušeniami.

Výber druhov

18. Odporúčané druhy rýb sú uvedené v dodatku 2. Postupy na zahrnutie nových druhov sú uvedené v bode 2.

Chov rodičovských rýb

19. Podrobnosti o chove rodičovských rýb za uspokojujúcich podmienok nájdete v usmernení OECD TG 210 (1). Rodičovské ryby sa majú kŕmiť vhodnou potravou raz alebo dvakrát denne.

Manipulácia s embryami a larvami

20. Embryá a larvy sa môžu najskôr exponovať v hlavnej komore umiestnené v menších komorách zo skla alebo nehrdzavejúcej ocele so sieťovanými bočnými alebo čelnými stenami, ktoré umožňujú tok testovanej chemikálie cez komoru. Neturbulentný tok cez tieto malé komory možno zabezpečiť ich zavesením na ramene upravenom na pohyb komory nadol a nahor tak, aby organizmy zostali vždy ponorené.

21. Ak sa v hlavnej testovacej komore použili nádoby, mriežky alebo sieťky na zadržiavanie vajíčok, tieto obmedzenia by sa po vyliahnutí lariev mali odstrániť okrem sieťok, ktoré by sa mali zachovať, aby sa zabránilo úniku rýb. Ak je potrebné preniesť larvy, nemali by sa vystaviť vzduchu a nemali by sa používať siete na vylovenie rýb z nádob na vajíčka. Načasovanie tohto prenosu sa mení v závislosti od druhu, pričom prenos nemusí byť vždy potrebný.

▼M6

Voda

22. Ako voda použitá na testovanie je vhodná každá voda, v ktorej testovacie druhy vykazujú kontrolné prežívanie aspoň také dobré ako vo vode opísanej v dodatku 3. Počas celého trvania testu má mať konštantnú kvalitu. V pravidelných intervaloch sa majú odoberať vzorky na analýzu, aby sa overilo, že riediaca voda neprimeraným spôsobom neovplyvňuje výsledky testu (napríklad reakciou s testovanou chemikáliou) alebo že nemá nepriaznivý vplyv na násadu rýb. Mal by sa merať celkový organický uhlík, vodivosť, pH a suspendované pevné látky, napríklad každé tri mesiace ak je známe, že riediaca voda má pomerne konštantnú kvalitu. Ak je kvalita vody pochybná, mal by sa merať obsah ťažkých kovov (napr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavných aniónov a katiónov (napr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}) a pesticídov. Údaje o chemickej analýze a odbere vody možno nájsť v bode 34.

Testovacie roztoky

23. Ak to je prakticky možné, mal by sa použiť prietokový systém. Na účely prietokových testov je potrebný systém, ktorý do skúšobných komôr nepretržite privádza a zrieďuje zásobný roztok testovanej chemikálie v sérii koncentrácií (napr. meracie čerpadlo, proporcionálny zmiešavač a saturačný systém). Prietoky zásobných roztokov a riediacej vody sa majú kontrolovať v určitých intervaloch počas testu, pričom sa v priebehu testu nesmú meniť o viac ako 10 %. Za vhodný sa považuje prietok zodpovedajúci aspoň piatim objemom skúšobnej komory za 24 hodín (1). Treba dbať na to, aby sa nepoužívali plastové trubice ani iné materiály, z ktorých niektoré môžu obsahovať biologicky aktívne chemikálie alebo môžu adsorbovať testovanú chemikáliu.

24. Zásobný roztok by sa podľa možnosti mal pripraviť bez použitia rozpúšťadiel jednoduchým premiešaním alebo pretrepaním testovanej chemikálie v riediacej vode s použitím mechanických prostriedkov (napr. miešaním alebo ultrazvukom). Ak sa testovaná chemikália ťažko rozpúšťa vo vode, mali by sa použiť postupy uvedené v usmerňovacom dokumente OECD o testovaní vodnej toxicity ťažkých látok a zmesí (36). Používaniu rozpúšťadiel sa treba vyhnúť, ale v niektorých prípadoch môže byť potrebné na vytvorenie vhodne koncentrovaného zásobného roztoku. Príklady vhodných rozpúšťadiel sú uvedené v literatúre (36).

25. Treba sa vyhnúť semistatickým testovacím podmienkam, pokiaľ to nie je odôvodnené závažnými dôvodmi spojenými s testovanou chemikáliou (napr. stabilitou, obmedzenou dostupnosťou, vysokými nákladmi alebo rizikom). V prípade semistatickej metódy možno použiť dva rôzne postupy obnovy. Buď sa nové testovacie roztoky pripravia v čistých komorách a prežívajúce vajíčka a larvy sa opatrne prenesú do nových komôr alebo sa testovacie organizmy nechajú v skúšobných komorách a časť (aspoň dve tretiny) testovacej vody sa mení každý deň.

POSTUP

Podmienky expozície

Zber vajíčok a trvanie

26. S cieľom zabrániť genetickému skresleniu sa odoberú vajíčka od najmenej troch chovných párov alebo skupín, následne sa zmiešajú a náhodne vyberú na test. V prípade pichľavky sivej si pozrite opis umelého oplodnenia v dodatku 11. Test by sa mal začať čo najskôr po oplodnení vajíčok, pričom embryá by sa podľa možnosti mali ponoriť do testovacích roztokov pred

▼M6

začiatkom ryhovania blastodisku alebo čo najskôr po tejto fáze a nie neskôr ako 12 hodín po oplodnení. Test by mal trvať dovtedy, kým sa v kontrolnej skupine neukončí pohlavná diferenciácia (60 dph pre medaku japonskú, pichľavku sivú i dánio pruhované).

Násada

27. Počet oplodnených vajíčok na začiatku testu musí byť aspoň 120 na každú koncentráciu. Toto množstvo sa rozdelí medzi minimálne štyri replikáty (prijateľné rozdelenie do kontrolnej skupiny je na základe funkcie druhej odmocniny). Vajíčka by mali byť náhodne distribuované medzi jednotlivými skupinami s rôznymi koncentráciami chemikálie (s použitím štatistických tabuliek na randomizáciu). Stupeň zaťaženia (vymedzenie pojmu nájdete v dodatku 1) by mal byť dostatočne nízky na to, aby bolo možné udržať koncentráciu rozpustného kyslíka aspoň 60 % ASV bez priameho prevzdušňovania komôr. Pri prietokových testoch sa odporúča, aby stupeň zaťaženia neprekročil 0,5 g/l počas 24 hodín, pričom nikdy nesmie prekročiť množstvo 5 g/l roztoku. Najneskôr do 28 dní po oplodnení by sa mal prerozdeliť počet rýb v replikátoch tak, aby každý replikát obsahoval pokiaľ možno množstvo rýb. Ak dôjde k úmrtnosti súvisiacej s expozíciou, počet replikátov by sa mal primerane znížiť tak, aby bola hustota rýb medzi skupinami s jednotlivými koncentráciami pokiaľ možno rovnaká.

Svetlo a teplota

28. Fotoperióda a teplota vody by mali byť vhodné pre testovacie druhy (pokusné podmienky testu FSDT nájdete v dodatku 2).

Kŕmenie

29. Potrava a kŕmenie sú rozhodujúce a je nevyhnutné, aby sa v každom štádiu poskytovala správna potrava vo vhodných časových intervaloch a v dostatočnom množstve na podporu normálneho rastu. Kŕmiť by sa malo *ad libitum* a zároveň by sa mal minimalizovať prebytok. Na dosiahnutie dostatočnej rýchlosti rastu sa ryby majú kŕmiť aspoň dvakrát denne (cez víkendy je prijateľné raz denne), pričom medzi každým kŕmením by mali byť aspoň tri hodiny. Nadbytočná potrava a výkaly sa majú podľa potreby odstrániť, aby sa nehromadil odpad. Na základe získaných skúsenosti sa potrava a kŕmne režimy neprestajne upravujú s cieľom zlepšiť prežívanie a optimalizovať rast. Preto je potrebné vyvinúť ie na to, aby navrhovaný režim potvrdili uznávaní odborníci. Kŕmenie sa neposkytne 24 hodín pred koncom testu. Príklady vhodnej potravy sú uvedené v dodatku 2 [pozri tiež rámec OECD pre testovanie rýb (39)].

Testované koncentrácie

30. Odstup medzi testovanými chemikáliami by mal zodpovedať opisu v dodatku 4. Majú sa použiť minimálne tri testované koncentrácie v aspoň štyroch replikátoch. Pri výbere rozsahu testovaných koncentrácií je potrebné vziať do úvahy krivku vzťahujúcu hodnotu LC_{50} k obdobiu expozície z dostupných štúdií akútnej toxicity. Ak sa údaje majú použiť na posúdenie rizika, odporúča sa päť testovaných koncentrácií.

31. Koncentrácie chemikálie vyššie ako 10 % hodnoty LC_{50} pre akútnu toxicitu pri dospelých jedincoch alebo 10 mg/l, podľa toho, ktorá hodnota je nižšia, sa nemusia testovať. Maximálna testovaná koncentrácia by mala byť 10 % LC_{50} v štádiu života larvy/mladého jedinca.

▼M6

Kontrolné skupiny

32. Okrem testovaných koncentrácií by sa mala analyzovať kontrolná skupina s riediacou vodou (≥ 4 replikáty) a podľa potreby aj kontrolná skupina s rozpúšťadlom (≥ 4 replikáty). V teste možno použiť iba rozpúšťadlá, o ktorých sa zistilo, že nemajú žiadny štatisticky významný vplyv na sledované parametre testu.

33. Ak sa použije rozpúšťadlo, jeho konečná koncentrácia nesmie byť vyššia ako 0,1 ml/l (36) a mala by byť rovnaká vo všetkých skúšobných komorách s výnimkou kontrolnej skupiny s riediacou vodou. Je však potrebné vynaložiť maximálne úsilie, aby sa predišlo použitiu rozpúšťadla alebo, aby sa jeho koncentrácia udržala na minime.

Frekvencia analytických stanovení a meraní

34. Pred začatím testu by sa mala vykonať chemická analýza koncentrácie testovanej chemikálie na kontrolu splnenia kritérií prijateľnosti. Všetky replikáty by sa mali analyzovať individuálne na začiatku a konci testu. Počas testu by sa aspoň raz za týždeň mal analyzovať jeden replikát na testovanú koncentráciu, pričom replikáty by sa mali systematicky obmieňať (1, 2, 3, 4, 1, 2…). Ak sa vzorky skladujú na neskoršiu analýzu, metódu skladovania vzoriek je potrebné vopred validovať. Vzorky sa majú filtrovať (napr. pomocou filtra s veľkosťou pórov 0,45 μm) alebo odstrediť, aby sa zabezpečilo, že stanovenia sa vykonajú na chemikálii v skutočnom roztoku.

35. Počas testu sa má vo všetkých skúšobných komorách merať rozpustený kyslík, pH, celková tvrdosť, vodivosť, slanosť (ak je relevantná) a teplota. Každý týždeň sa má merať aspoň rozpustený kyslík, slanosť (ak je relevantná) a teplota. Hodnota pH, vodivosť a tvrdosť sa majú merať na začiatku a konci testu. Teplota sa má podľa možnosti nepretržite monitorovať aspoň v jednej skúšobnej komore.

36. Výsledky by mali byť založené na nameraných koncentráciách. Ak sa však koncentrácia testovanej látky v roztoku počas celého testu uspokojivo udržiavala v rozmedzí ± 20 % nominálnej koncentrácie, potom výsledky môžu byť založené buď na nominálnych alebo na nameraných hodnotách.

Pozorovania a merania

Štádium embryonálneho vývinu

37. Expozícia by sa mala začať čo najskôr po oplodnení a pred začiatkom ryhovania blastodisku a nie neskôr ako 12 hodín po oplodnení, aby sa zabezpečila expozícia počas skorého embryonálneho vývinu.

Liahnutie a prežívanie

38. Pozorovania liahnutia a prežívania by sa mali vykonávať aspoň raz za deň a mali by sa zaznamenať príslušné počty. Mŕtve embryá, larvy a mladé ryby je potrebné odstrániť ihneď ako sa spozorujú, lebo sa môžu rýchlo rozkladať a môže ich narušiť činnosť iných rýb. Mimoriadnu pozornosť treba venovať tomu, aby sa pri odstraňovaní mŕtvych jedincov neudreli alebo fyzicky nepoškodili susedné vajíčka/larvy, ktoré sú mimoriadne krehké a citlivé. Kritériá úhynu sa menia podľa štádia života:

— vajíčka: najmä v skorých štádiách výrazná strata priesvitnosti a zmena sfarbenia spôsobená koaguláciou a/alebo zrážaním proteínov vedúca k bielemu nepriehľadnému vzhľadu,

▼M6

— larvy a mladé ryby: nepohyblivosť a/alebo neprítomnosť respiračných pohybov a/alebo neprítomnosť tepu srdca a/alebo biele nepriehľadné sfarbenie centrálneho nervového systému a/alebo nereagovanie na mechanické podnety.

Abnormálny vzhľad

39. Je potrebné zaznamenať počet lariev alebo rýb s abnormálnym tvarom tela a opísať vzhľad a charakter abnormality. Treba poznamenať, že abnormálne embryá a larvy sa vyskytujú prirodzene a pri niektorých druhoch môžu byť rádovo v rozmedzí niekoľkých percent v kontrolných skupinách. Abnormálne živočíchy sa majú zo skúšobnej komory odstrániť len v prípade úhynu. V súlade so smernicou Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2010 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely však v prípade, že abnormality spôsobujú bolesť, utrpenie, strach alebo trvalé poškodenie a možno spoľahlivo predvídať smrť, je potrebné živočíchy umŕtviť a usmrtiť podľa opisu v bode 44 a na účely analýzy údajov považovať za uhynuté.

Abnormálne správanie

40. Ak sa vyskytnú abnormality, napr. hyperventilácia, nekoordinované plávanie, netypická nehybnosť a netypické správanie pri kŕmení, je potrebné ich výskyt zaznamenať.

Hmotnosť

41. Na konci testu sa všetky prežívajúce ryby musia usmrtiť (umŕtviť ak sa majú odobrať krvné vzorky) a odmeria sa individuálna mokrá hmotnosť (ryby vytreté do sucha).

Dĺžka

42. Na konci testu sa odmeria dĺžka jednotlivých rýb (štandardná dĺžka).

43. Na základe týchto pozorovaní sa získajú niektoré alebo všetky z nasledujúcich údajov, ktoré možno uviesť v správe:

— kumulovaná mortalita,

— počet zdravých rýb na konci testu,

— čas do začiatku liahnutia a konca liahnutia,

— dĺžka a hmotnosť prežívajúcich živočíchov,

— počet deformovaných lariev,

— počet rýb s abnormálnym správaním.

Odber vzoriek rýb

44. Odber vzoriek rýb sa vykonáva na konci testu. Odobraté ryby sa majú usmrtiť napr. pomocou látky MS-222 (100 – 500 mg/l tlmenej 200 mg $NaHCO_3$/l) alebo FA-100 (4-alyl-2-metoxyfenol: eugenol) a individuálne odmerať a odvážiť (mokrá hmotnosť, ryby vytreté do sucha) alebo umŕtviť ak sa majú odobrať krvné vzorky (pozri bod 49).

Odber vzoriek na analýzu VTG a určenie pohlavia prostredníctvom histologického hodnotenia

45. Všetky ryby sa majú odobrať a pripraviť na analýzu pohlavia a VTG. Všetky ryby sa majú histologicky analyzovať na účely určenia pohlavia.

▼**M6**

Na účely merania VTG je prijateľné odobrať podvzorku aspoň 16 rýb z každého replikátu. Ak sú výsledky analýzy VTG podvzoriek nejasné, je potrebné analyzovať viac rýb.

46. Postup odberu vzoriek na analýzu VTG a určenie pohlavia závisí od metódy analýzy VTG:

Metóda homogenátu hlavy/chvosta na účely analýzy VTG

47. Ryby sa usmrtia. Hlava a chvost z každej ryby sa skalpelom oddelia od tela ryby rezmi bezprostredne za prsnými plutvami a hneď za chrbtovou plutvou (pozri obrázok 1). Hlavová a chvostová časť každej ryby sa na účely analýzy VTG spoja, odvážia a jednotlivo očíslujú, zmrazia v tekutom dusíku a skladujú pri teplote – 70 C alebo nižšej. Telová časť ryby sa očísluje a zafixuje vo vhodnom fixačnom prostriedku na účely histologického hodnotenia (22). Pomocou tejto metódy sa vyhodnotí VTG a histopatológia na každom jedincovi, takže prípadná zmena v hladine VTG sa môže dať do súvislosti s fenotypovým pohlavím ryby alebo genetickým pohlavím (medaka japonská a pichľavka sivá) ryby. Ďalšie informácie nájdete v usmernení pre homogenizáciu (dodatok 5) a usmernení pre kvantifikáciu VTG (dodatok 6).

Metóda homogenátu pečene na účely analýzy VTG

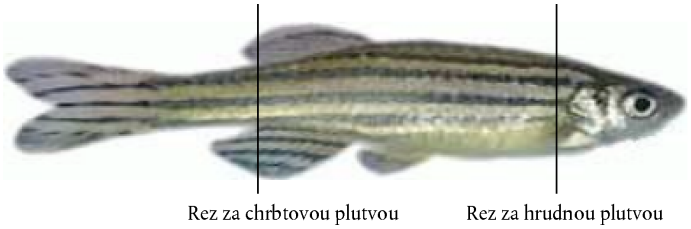
48. Ryby sa usmrtia. Pečeň sa oddelí rezom a skladuje pri teplote – 70 C alebo nižšej. Odporúčané postupy na vyrezanie pečene a predbežné spracovanie nájdete v usmernení OECD TG 229 (37) alebo v kapitole C.37 tejto prílohy (38). Pečene sa potom individuálne homogenizujú podľa opisu v usmernení OECD TG 229 alebo v kapitole C.37 tejto prílohy. Odobratý supernatant sa použije na odmeranie VTG pomocou homologickej metódy ELISA [príklad kvantifikácie nájdete v dodatku 6 pre dánio pruhované alebo v usmernení OECD TG 229 (37) pre medaku japonskú]. S použitím tohto prístupu je tiež možné získať údaje o VTG a histológii gonád jednotlivých rýb.

Metóda krvnej plazmy na účely analýzy VTG

49. Krv sa odoberie z umŕtvených rýb vpichom do srdca, rezom chvostovej žily alebo chvosta a odstredí sa pri teplote 4 °C na účely odberu plazmy. Plazma sa až do použitia skladuje pri teplote – 70 °C alebo nižšej. Celá ryba sa usmrtí a zafixuje na účely histologického vyšetrenia. Vzorky plazmy i samotné ryby sa individuálne očíslujú, aby bolo možné stanoviť súvislosť hladiny VTG s pohlavím ryby.

Obrázok 1

Ako rezať rybu na účely merania VTG pomocou homogenátu hlavy/chvosta a histologického hodnotenia strednej časti



▼M6

Určenie genetického pohlavia

50. V prípade druhov s vhodnými markermi sa na určenie genetického pohlavia odoberú biologické vzorky jednotlivých rýb. V prípade medaky japonskej sa odoberie análna alebo chrbtová plutva. Podrobný opis je uvedený v dodatku 9 vrátane odberu tkaniva a určenia pohlavia metódou PCR. Opis odberu tkaniva a určenia pohlavia metódou PCR pre pichľavku sivú je uvedený v dodatku 10.

Meranie VTG

51. Meranie VTG by malo byť založené na kvantitatívnej a analyticky validovanej metóde. Mali by byť k dispozícii informácie o variabilite metódy, ktorá sa použila v danom laboratóriu, v rámci skúšky a medzi skúškami. Zdroj variability v rámci laboratória a medzi laboratóriami je (najpravdepodobnejšie) založený na rôznych vývinových štádiách populácie rýb. Vzhľadom na variabilitu merania VTG by sa k hodnotám NOEC založeným len na tomto sledovanom parametri malo pristupovať veľmi opatrne. Sú k dispozícii rôzne metódy na posúdenie tvorby VTG pri druhoch rýb použitých v tejto skúške. Pomerne citlivou a zároveň špecifickou meracou metódou je stanovenie koncentrácie bielkovín pomocou enzýmového imunosorbentového stanovenia (ELISA). Mali by sa použiť homologické protilátky (vytvorené proti VTG rovnakého druhu) a najdôležitejšie homologické štandardy.

Určenie pohlavia

52. V závislosti od postupu odberu vzoriek na analýzu VTG sa celá ryba alebo zvyšná stredná časť každej ryby umiestni do označenej spracovacej kazety a zafixuje vo vhodnom fixačnom prostriedku na účely histologického určenia pohlavia (voliteľne aj na vyhodnotenie štádia gonád). Usmernenia na fixáciu a zaliatie sú uvedené v dodatku 7 ako aj v usmerňovacom dokumente OECD o diagnóze endokrinnej histopatológie gonád rýb (22). Po spracovaní sa ryby zalejú do parafínových blokov. Ryby sa do parafínového bloku umiestňujú pozdĺžne. Z každého jedinca sa odoberie aspoň šesť pozdĺžnych rezov (s hrúbkou 3 – 5 μm) v čelnej rovine, ktoré obsahujú tkanivo z obidvoch gonád. Rozstup medzi týmito rezmi by mal byť približne 50 μm pri samčekoch a 250 μm pri samičkách. Keďže však každý blok bude často obsahovať samčekov i samičky (ak je v každom bloku zaliatych viac jedincov), rozstup medzi rezmi z týchto blokov by mal byť približne 50 μm, kým sa nezíska aspoň šesť rezov gonád z každého samčeka. Potom možno rozstup medzi rezmi zvýšiť na približne 250 μm pre samičky. Rezy sa zafarbia hematoxylínom a eozínom a vyhodnotia pomocou svetelnej mikroskopie s dôrazom na pohlavie (samčie, samičie, intersexuálne alebo nediferencované). Intersexuál je vymedzený ako prítomnosť viac, ako jedného oocytu v semenníkoch na šesť analyzovaných rezov alebo prítomnosť spermatogénnych buniek (áno/nie) vo vaječníkoch. Histopatologické vyšetrenie a stanovenie štádia vaječníkov a semenníkov je voliteľné, ale ak sa vykonáva, výsledky sa majú štatisticky analyzovať a uviesť do správy. Treba poznamenať, že niektoré druhy rýb prirodzene nemajú plne vyvinutý pár gonád a môže byť prítomná len jedna gonáda (napr. medaka japonská a príležitostne dánio pruhované). Všetky tieto pozorovania sa musia zaznamenať.

53. Určenie genetického pohlavia pri jednotlivých medakách japonských je založené na prítomnosti alebo neprítomnosti génu určujúceho samčie pohlavie pri medakáchch DMY, ktorý sa nachádza na chromozóme Y. Genotypové pohlavie medaky možno identifikovať sekvenovaním génu DMY z DNA

▼M6

vyextrahovanej napríklad z kúska análnej alebo chrbtovej plutvy. Prítomnosť génu DMY znamená samčieho jedinca (XY) bez ohľadu na fenotyp, zatiaľ čo chýbajúci gén DMY znamená samičieho jedinca (XX) bez ohľadu na fenotyp (23). Usmernenie na prípravu tkaniva a použitie metódy PCR sú uvedené v dodatku 9. Genetické pohlavie jednotlivých pichľaviek sivých sa takisto určuje metódou PCR, ktorá je opísaná v dodatku 10.

54. Výskyt intersexuálov (vymedzenie pojmu je uvedené v dodatku 1) je potrebné uviesť do správy.

Sekundárne pohlavné znaky

55. Pri druhoch ako medaka japonská sekundárne pohlavné znaky reguluje endokrinný systém. Pozorovania fyzického vzhľadu rýb by sa preto mali podľa možnosti uskutočniť na konci expozície. V prípade medaky japonskej je bradavkový útvar v zadnej časti análnej plutvy samičiek citlivý na androgén. Kapitola C.37 tejto prílohy (38) obsahuje príslušné fotografie samčích sekundárnych pohlavných znakov a androgenizovaných samičiek.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

56. Je dôležité, aby sa sledovaný parameter vyhodnocoval pomocou najsilnejšieho platného štatistického testu. Pokusnou jednotkou je replikát, ale do štatistického testovania je potrebné zahrnúť aj variabilitu v rámci replikátu. V dodatku 8 je uvedená schéma rozhodovania ako pomôcka pri výbere najvhodnejšieho štatistického testu na základe povahy údajov získaných z testu. Hladina štatistickej významnosti pre všetky zahrnuté sledované parametre je 0,05.

Podiel pohlaví a genetických pohlaví

57. Podiely pohlaví sa majú analyzovať z hľadiska významného účinku (prístup NOEC/LOEC) expozície pomocou Jonckheereho-Terpstrovho (trendového) testu ak existuje monotónny priebeh krivky závislosti dávka-odpoveď. Ak sa zistí nemonotónnosť, je potrebné použiť párový test. V prípade normality a homogénneho rozptylu použite Dunnettov test. V prípade heterogénneho rozptylu použite Tamhaneho-Dunnettov test. V ostatných prípadoch použite presný Mann-Whitneyho test s Bonferroniho-Holmovou úpravou. Dodatok 8 obsahuje schému opisujúcu štatistiku pre podiely pohlaví. Podiely pohlaví sa musia uvádzať v tabuľkách ako podiely koncentrácií ± SD pre samčekov, samičky, intersexuálov a nediferencované jedince. Je potrebné uviesť štatistickú významnosť. Príklady sú uvedené vo validačnej správe o teste FSDT, fáza 2 (42). Genetické pohlavie sa uvádza ako percento zmeny fenotypového pohlavia pre samčekov, samičky, intersexuálov a nediferencované jedince.

Koncentrácie VTG

58. Koncentrácie VTG sa majú analyzovať z hľadiska významného účinku (prístup NOEC/LOEC) expozície. Uprednostňuje sa Dunnettov test pred t-testom s Bonferroniho korekciou. Ak sa použije Bonferroniho korekcia, uprednostňuje sa Bonferroniho-Holmova korekcia. Je možné urobiť logaritmickú transformáciu hodnôt VTG, aby sa dosiahla normalita a homogenita rozptylu. Ďalej ak je závislosť veličiny od koncentrácie v súlade s monotónnosťou, namiesto všetkých uvedených testov sa uprednostňuje Jonckheereho-Terpstrov test. Ak sa použijú t-testy alebo Dunnettov test, nie je potrebné dosiahnuť významnosť v F-teste analýzy ANOVA na to, aby

▼M6

bolo možné pokračovať. Podrobnosti nájdete v schéme v dodatku 8. Výsledky sa majú uvádzať v tabuľkách ako priemery koncentrácií ± SD samostatne pre samčekov, samičky, intersexuálov a nediferencované jedince. Je potrebné uviesť štatistickú významnosť pre fenotypové samičky a fenotypových samčekov. Príklady sú uvedené vo validačnej správe o teste FSDT, fáza 2 (42).

Skutočné koncentrácie testovanej chemikálie

59. Skutočné koncentrácie testovanej chemikálie v komorách sa majú analyzovať vo frekvenciách uvedených v bode 34. Výsledky sa majú uvádzať v tabuľkách ako priemerná koncentrácia ± SD pre replikáty a pre jednotlivé koncentrácie, pričom treba uviesť informácie o počte vzoriek a extrémnych hodnotách odchyľujúcich sa od priemernej koncentrácie v jednotlivých skupinách o ± 20 %. Príklady sú uvedené vo validačnej správe o teste FSDT, fáza 2 (42).

Interpretácia výsledkov

60. Výsledky by sa mali interpretovať s opatrnosťou ak namerané koncentrácie testovanej chemikálie v testovacích roztokoch dosahujú úrovne blízke detekčnému limitu analytickej metódy.

Protokol o skúške

61. Protokol o skúške musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— fyzikálno-chemické vlastnosti, chemické identifikačné údaje vrátane čistoty a analytickej metódy kvantifikácie testovanej chemikálie.

Podmienky testu

— použitý postup testu (napr. prietokový, semistatický/obnovovací), koncepcia testu vrátane testovaných koncentrácií, metódy prípravy zásobných roztokov (v prílohe), frekvencie obnovovania (ak sa použije solubilizačný prostriedok, musí sa uviesť jeho názov a koncentrácia),

— nominálne testované koncentrácie, priemery nameraných hodnôt a ich štandardné odchýlky v skúšobných komorách a metóda akou sa vypočítali (použitá analytická metóda by mala byť uvedená v prílohe), dôkaz o tom, že merania odkazujú na koncentrácie testovanej chemikálie v skutočnom roztoku,

— kvalita vody v skúšobných komorách: pH, tvrdosť, teplota a koncentrácia rozpustného kyslíka,

— podrobné informácie o kŕmení (napr. druh potravy, zdroj, podávané množstvo a frekvencia a analýzy kontaminujúcich látok (napr. PCB, PAH a organochlórové pesticídy) ak to je relevantné.

Výsledky

— dôkaz, že kontrolné skupiny splnili kritériá validity: údaje o miere liahnutia by sa mali uviesť v tabuľkách ako percento na replikát a na koncentráciu. Je potrebné zdôrazniť odchýlky od kritérií prijateľnosti (v kontrolných skupinách). Údaje o prežití by sa mali uviesť ako percento na replikát a na koncentráciu. Je potrebné zdôrazniť odchýlky od kritérií validity (v kontrolných skupinách),

— jasné uvedenie výsledkov získaných pre rôzne sledované parametre: prežívanie embryí a úspech liahnutia, externé abnormality, dĺžka a hmotnosť,

▼M6

merania VTG (ng/g homogenátu, ng/ml plazmy alebo ng/mg pečene), histológia gonád, výskyt akýchkoľvek nezvyčajných reakcií rýb a akékoľvek viditeľné účinky testovanej chemikálie.

62. Výsledky sa majú uviesť ako priemerné hodnoty ± štandardná odchýlka (SD) alebo štandardná chyba (SE). Štatistické údaje sa majú uvádzať minimálne ako hodnoty NOEC a LOEC a intervaly spoľahlivosti. Je potrebné dodržiavať štatistickú schému (dodatok 8).

LITERATÚRA

1. OECD (1992), Fish, Early Life Stage Toxicity Test, Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paríž.

2. Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Sumpter, 1996, „Inhibition of testicular growth in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals“, Environmental Toxicology and Chemistry 15, s. 194 – 202.

3. Sumpter, J.P. a S. Jobling, 1995, „Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment“, Environmental Health Perspectives 103, s. 173 – 178.

4. Tyler, C.R., R.van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix a 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, s. 337 – 347.

5. Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen a 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, s. 119 – 131.

6. Andersen, L., P. Bjerregaard a B. Korsgaard (2003), „Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters“, Fish Physiology and Biochemistry 28, s. 319 – 321.

7. Orn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren a G.I. Petersen (2003), „Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (Danio rerio) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone“ aquatic Toxicology 65, s. 397 – 411.

8. Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Sumpter, M. Zerulla a C.R. Tyler (2002), „Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances“, Environmental Toxicology and Chemistry 21, s. 319 – 326.

9. Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear a 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, s. 533 – 541.

10. Parks, L.G. a.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc a 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, s. 113 – 125.

11. Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem a. Goksoyr a 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, s. 1699 – 1708.

12. Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara a 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, s. 161 – 169.

13. Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James a 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, s. 311 – 326.

14. Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita a T. Iguchi (2004), „Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka“, Journal of Health Science 50, s. 301 – 308.

15. Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson a A. Goksoyr (2006), „Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin. Aquatic Toxicology“, 78, s. 202 – 206.

16. Jensen, K.M. a G.T. Ankley (2006), „Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)“, Ecotoxicology and Environmental Safety 64, s. 101 – 105.

17. Holbech, H., Petersen, G. I., Norman a., Örn, S, Norrgren, L. a 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, s. 48 – 51.

18. Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher a A. Goksoyr (2004), „Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening“ analytical and Bioanalytical Chemistry 378, s. 621 – 633.

19. Orn, S., S. Yamani a 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, s. 237 – 243.

20. Scholz, S. a N. Kluver (2009), „Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish“, Sexual Development 3, s. 136 – 151.

21. Fenske, M., G. Maack, C. Schafers a H. Segner (2005), „An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, Danio rerio“, Environmental Toxicology and Chemistry 24, s. 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, Paríž.

23. Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi a. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata a Y. Nagahama (2004), „Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, Oryzias latipes“, Developmental Dynamics 231, s. 518 – 526.

24. Shinomiya a., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi a M. Sakaizumi (2004), „Field survey of sex-reversals in the medaka, Oryzias latipes: genotypic sexing of wild populations“, Zoological Science 21, s. 613 – 619.

25. Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak a 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, s. 8897 – 8901.

26. Palace,V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron a 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, s. 1920 – 1935.

27. Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno a 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, s. 279 – 290.

▼**M6**

28. Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren a P. Bjerregaard (2006), „Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)“, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 144, s. 57 – 66.

29. Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard a 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, s. 257 – 266.

30. Morthorst, J.E., H. Holbech a P. Bjerregaard (2010), „Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations“, Aquatic Toxicology 98, s. 336 – 343.

31. Kiparissis,Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch a C.D. Metcalf (2003), „Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*)“, Aquatic Toxicology 63, s. 391 – 403.

32. Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley a 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, s. 11 – 21.

33. Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen a P. Bjerregaard (2007), „Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*)“, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, s. 165 – 170.

34. Kapitola C.14 tejto prílohy, rastová skúška na mladých jedincoch.

35. Kapitola C.4 tejto prílohy, ľahká biodegradovateľnosť.

36. OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paríž.

37. OECD (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay,* Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paríž.

38. Kapitola C.37 tejto prílohy, 21-Day Fish Assay: A Short Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition.

39. OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Paríž

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 s 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, Paríž.

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, Paríž.

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, Paríž.

44. Smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2010 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely. Ú. v. EÚ L 276, 20.10.2010, s. 33.

▼M6

Dodatok 1

Skratky a vymedzenie pojmov

Vrcholový sledovaný parameter: účinok pôsobiaci na úrovni populácie.

ASV: rozpustnosť vzdušného kyslíka.

Biomarker: účinok pôsobiaci na úrovni jedinca.

Chemikália: látka alebo zmes.

Dph: dni po vyliahnutí.

DMY: gén domény DM špecifický pre chromozómom Y potrebný na vývin samčekov rýb rodu medaka.

ELISA: enzýmové imunosorbentové stanovenie

Hmotnosť ryby: mokrá hmotnosť ryby (vytretej do sucha).

FSDT: test pohlavného vývinu rýb.

Os HPG: os hypotalamus – hypofýza – gonády.

Intersexuálna ryba: ryba s viac ako jedným oocytom v semenníkoch na 6 analyzovaných rezov alebo so spermatogénnymi bunkami (áno/nie) vo vaječníkoch.

Stupeň zaťaženia: mokrá hmotnosť rýb na objem vody.

MOA: spôsob pôsobenia.

RT-PCR: polymerázová reťazová reakcia s reverznou transkriptázou.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Nediferencovaná ryba: ryba s gonádami bez rozoznateľných zárodočných buniek.

VTG: vitellogenín.

▼**M6**

Dodatok 2

Experimentálne podmienky testu FSDT (sladkovodné druhy)

1. Odporúčané druhy	Medaka japonská (*Oryzias latipes*)	Dánio pruhované (*Danio rerio*)	Pichľavka sivá (*Gasterosteus aculeatus*)
2. Druh testu	Prietokový alebo semistatický	Prietokový alebo semistatický	Prietokový alebo semistatický
3. Teplota vody	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Kvalita osvetlenia	Žiarivky (široké spektrum)	Žiarivky (široké spektrum)	Žiarivky (široké spektrum)
5. Intenzita svetla:	10 – 20 μE/m^2/s, 540 – 1 080 luxov alebo 50 – 100 ft-c (úrovne v laboratórnom prostredí)	10 – 20 μE/m^2/s, 540 – 1 080 luxov alebo 50 – 100 ft-c (úrovne v laboratórnom prostredí)	10 – 20 μE/m^2/s, 540 – 1 080 luxov alebo 50 – 100 ft-c (úrovne v laboratórnom prostredí)
6. Fotoperióda	12 – 16 hod. svetlo, 8 – 12 hod. tma	12 – 16 hod. svetlo, 8 – 12 hod. tma	16 hod. svetlo, 8 hod. tma
7. Minimálna veľkosť komory	Jednotlivé komory by mali obsahovať minimálne 7 l vody	Jednotlivé komory by mali obsahovať minimálne 7 l vody	Jednotlivé komory by mali obsahovať minimálne 7 l vody
8. Výmena objemu testovacích roztokov	Minimálne päťkrát denne	Minimálne päťkrát denne	Minimálne päťkrát denne
9. Vek testovacích organizmov na začiatku expozície	Čerstvo oplodnené vajíčka (skoré štádium blastuly)	Čerstvo oplodnené vajíčka (skoré štádium blastuly)	Čerstvo oplodnené vajíčka
10. Počet vajíčok na testovanú koncentráciu	Minimálne 120	Minimálne 120	Minimálne 120
11. Počet testovaných koncentrácií	Minimálne tri (plus primerané kontrolné skupiny)	Minimálne tri (plus primerané kontrolné skupiny)	Minimálne tri (plus primerané kontrolné skupiny)
12. Počet replikátov na testovanú koncentráciu	Minimálne štyri (okrem kontrolných skupín, kde sa počet určí podľa funkcie druhej odmocniny)	Minimálne štyri (okrem kontrolných skupín, kde sa počet určí podľa funkcie druhej odmocniny)	Minimálne štyri (okrem kontrolných skupín, kde sa počet určí podľa funkcie druhej odmocniny)
13. Kŕmny režim	Živé žiabronôžky rodu *Artemia*, dospelé zmrazené žiabronôžky soľné, vločkové krmivo atď. Odporúča sa kŕmiť dvakrát denne.	Špeciálna potrava pre mladé ryby, živé žiabronôžky rodu *Artemia*, dospelé zmrazené žiabronôžky soľné, vločkové krmivo atď. Odporúča sa kŕmiť dvakrát denne.	Živé žiabronôžky rodu *Artemia*, dospelé zmrazené žiabronôžky soľné, vločkové krmivo atď. Odporúča sa kŕmiť dvakrát denne.
14. Vetranie	Žiadne, pokiaľ koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesne pod 60 % saturáciu	Žiadne, pokiaľ koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesne pod 60 % saturáciu	Žiadne, pokiaľ koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesne pod 70 % saturáciu

▼**M6**

15. Riediaca voda	Čistá povrchová, studňová alebo rekonštituovaná voda	Čistá povrchová, studňová alebo rekonštituovaná voda	Čistá povrchová, studňová alebo rekonštituovaná voda
16. Trvanie expozície testovanej chemikálii	60 dph	60 dph	60 dph
17. Biologické sledované parametre	Úspešné vyliahnutie, prežitie, výrazná morfológia, VTG, histológia gonád, genetické pohlavie, pomer pohlaví	Úspešné vyliahnutie, prežitie, výrazná morfológia, VTG, histológia gonád, pomer pohlaví	Úspešné vyliahnutie, prežitie, výrazná morfológia, VTG, histológia gonád, pomer pohlaví
18. Kritériá prijateľnosti testu pre spojené replikáty kontrolných skupín	Úspešné vyliahnutie > 80 %	Úspešné vyliahnutie > 80 %	Úspešné vyliahnutie > 80 %
	Prežitie po vyliahnutí ≥ 70 %	Prežitie po vyliahnutí ≥ 70 %	Prežitie po vyliahnutí ≥ 70 %
	Rast (mokrá hmotnosť ryby vytretej do sucha) > 150 mg	Rast (mokrá hmotnosť ryby vytretej do sucha) > 75 mg	Rast (mokrá hmotnosť ryby vytretej do sucha) > 120 mg
	Dĺžka (štandardná dĺžka) > 20 mm	Dĺžka (štandardná dĺžka) > 14 mm	Dĺžka (štandardná dĺžka) > 20 mm
	Pomer pohlaví (% samčekov alebo samičiek) 30 – 70 %	Pomer pohlaví (% samčekov alebo samičiek) 30 – 70 %	Pomer pohlaví (% samčekov alebo samičiek) 30 – 70 %

▼**M6**

Dodatok 3

Chemické charakteristiky prijateľnej riediacej vody

ZLOŽKA	KONCENTRÁCIA
Tuhé častice	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Zostatkový chlór	< 10 µg/l
Celkové organofosfátové pesticídy	< 50 ng/l
Celkové organochlórové pesticídy a polychlórované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlór	< 25 ng/l

▼**M6**

Dodatok 4

Podľa testovacej metódy C.14/Usmernenie o testovaných koncentráciách

Stĺpec (počet koncentrácií medzi 100 a 10 alebo medzi 10 a 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

(*) Zo stĺpca možno vybrať sériu troch (alebo viacerých) za sebou idúcich koncentrácií. Stredné body medzi koncentráciami v stĺpci (x) sa nachádzajú v stĺpci (2x + 1). Uvedené hodnoty môžu predstavovať koncentrácie vyjadrené ako percento na objem alebo hmotnosť (mg/l alebo µg/l). Hodnoty je podľa potreby možné násobiť alebo deliť akoukoľvek mocninou 10. Hodnoty v stĺpci 1 sa môžu použiť v prípade značnej neistoty v súvislosti s úrovňou toxicity.

▼M6

Dodatok 5

Usmernenie na homogenizáciu hlavy a chvosta z mladých jedincov dánia pruhovaného, čereble potočnej, pichľavky sivej a medaky japonskej

Účelom tohto oddielu je opísať postupy, ktoré sa vykonávajú pred kvantifikáciou koncentrácie VTG. Možno použiť aj iné postupy, ktoré vedú k porovnateľnej kvantifikácii VTG. Namiesto homogenátu hlavy/chvosta je možné určiť koncentráciu VTG aj v krvnej plazme alebo pečeni.

Postup

1. Ryby sa umŕtvia a usmrtia v súlade s opisom testu.

2. Oddelí sa hlava a chvost ryby v súlade s opisom testu. **Dôležité**: Všetky nástroje a doska na rezanie sa musia medzi manipuláciami s jednotlivými rybami riadne vyčistiť a opláchnuť (napr. 96 % etanolom), aby sa zabránilo „znečisteniu VTG“ zo samičiek alebo indukovaných samčekov na neindukovaných samčekov.

3. Hmotnosť hlavy a chvosta spolu z každej ryby sa odmeria s presnosťou na mg.

4. Po odvážení sa časti tela umiestnia do vhodných skúmaviek (napr. do 1,5 ml Eppendorfovej skúmavky) a zmrazia pri teplote – 80 °C až do homogenizácie alebo sa priamo homogenizujú na ľade pomocou dvoch plastových piestikov. (Môžu sa použiť aj iné metódy, ak sa vykonávajú na ľade a výsledkom je homogénna hmota). **Dôležité**: *Skúmavky musia byť náležite očíslované tak, aby bolo možné hlavu a chvost z ryby priradiť k príslušnému rezu tela použitému na histologické vyšetrenie gonád*.

5. Po vytvorení homogénnej hmoty sa pridá množstvo ľadovo studeného **homogenizačného tlmivého roztoku** (*) zodpovedajúce štvor- až desaťnásobku hmotnosti tkaniva (poznamenajte si riedenie). Pokračujte v práci s piestikmi, kým zmes nebude homogénna. **Dôležitá poznámka**: *Pre každú rybu sa používajú nové piestiky*.

6. Vzorky sa umiestnia na ľad až do odstredenia pri teplote **4 °C** pri 50 000 g počas 30 minút.

7. Pipetou preneste dávky 20 – 50 µl (poznamenajte si množstvo) supernatantu **aspoň** do **dvoch** skúmaviek tak, že namočíte hrot pipety pod vrstvu tuku na povrchu a starostlivo odsajete supernatant bez tukových alebo peletových frakcií.

8. Skúmavky sa až do použitia skladujú pri teplote – 80 °C.

(*) *Homogenizačný tlmivý roztok:*

50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 % koktail inhibítorov proteázy (Sigma): 12 ml Tris-HCl, pH 7,4 + 120 µl koktailu inhibítorov proteázy (alebo ekvivalentného koktailu inhibítorov proteázy).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Koktail inhibítorov proteázy: Od firmy Sigma (pre tkanivo cicavcov), číslo produktu **P 8340**.

Poznámka: Homogenizačný tlmivý roztok by sa mal použiť v ten istý deň, ako bol vyrobený. Počas používania ho umiestnite na ľad.

▼M6

Dodatok 6

Usmernenie na kvantifikáciu vitellogenínu z homogenátu hlavy a chvosta dánia pruhovaného (*danio rerio*) (upravené z holbecha a kol., 2001). možno použiť aj iné postupy využívajúce homológne protilátky a štandardy.

1. Mikrotitračné platne (certifikované Maxisorp F96, Nunc, Roskilde, Dánsko) potiahnuté 5 µg/ml IgG proti lipovitellínu dánia pruhovaného sa rozmrazia a trikrát premyjú premývacím tlmivým roztokom (*).

2. Purifikovaný štandardný roztok vitellogenínu dánia pruhovaného ([1]) sa sériovo zriedi na 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10 a 20 ng/ml v riediacom tlmivom roztoku (**). Vzorky sa v riediacom tlmivom roztoku riedia aspoň 200-krát (aby nedošlo k efektu matrice) a aplikujú sa na platne. Kontrola skúšky sa aplikuje ako duplikát. Do každej jamky sa aplikuje 150 µl. Štandardy sa aplikujú v duplikátoch a vzorky v triplikátoch. Inkubujte cez noc pri teplote 4 °C na trepačke.

3. Platne sa päťkrát premyjú premývacím tlmivým roztokom. (*)

4. HRP pripojená k dextranovému reťazcu (napr. AMDEX A/S, Dánsko) a konjugované protilátky sa zriedia v premývacom tlmivom roztoku. Skutočné riedenie sa líši podľa šarže a veku. Do každej jamky sa aplikuje 150 µl a platne sa 1 hodinu inkubujú pri izbovej teplote na trepačke.

5. Platne sa päťkrát premyjú premývacím tlmivým roztokom (*) a spodok platní sa opatrne vyčistí etanolom.

6. Do každej jamky sa aplikuje 150 µl roztoku TMB plus (***). Platňu chráňte pred svetlom staniolom a sledujte vývoj farby na trepačke.

7. Keď sa plne vytvorí krivka štandardného roztoku, enzymatická aktivita sa zastaví pridaním 150 µl 0,2 M H_2SO_4 do každej jamky.

8. Absorbancia sa meria pri 450 nm (napr. na zariadení na čítanie platní Thermomax od spoločnosti Molecular Devices). Údaje sa analyzujú na pripojenom softvéri (napr. Softmax).

(*) Premývací tlmivý roztok:

PBS-stock (****)	500,0	ml
BSA	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

Upravte pH na 7,3 a doplňte na 5 l milipórovej H_2O. Skladujte pri teplote 4 °C.

(**) Riediaci tlmivý roztok:

PBS-Stock****	100,0	ml
BSA	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

Upravte pH na 7,3 a doplňte na 1 l milipórovej H_2O. Skladujte pri teplote 4 °C.

(***) TMB plus je „hotový“ substrát vyrobený spoločnosťou KemEnTec (Dánsko). Je citlivý na svetlo. Skladujte pri teplote 4 °C.

([1]) Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), purifikované podľa: 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 stock

NaCl	160,0	g
KH_2PO_4	4,0	g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	26,6	g
KCl	4,0	g

Upravte pH na 6,8 a doplňte na 2 l milipórovou vodou. Skladujte pri izbovej teplote.

▼M6

Dodatok 7

Usmernenie na prípravu rezov tkaniva na účely určenia pohlavia a štádia gonád

Účelom tohto oddielu je opísať postupy, ktoré sa vykonávajú pred hodnotením histologických rezov. Možno použiť aj iné postupy, ktoré vedú k podobnému určeniu pohlavia a štádia gonád.

Až na niekoľko výnimiek sú tieto postupy podobné pre medaku japonskú (JMD) a dánio pruhované (ZF).

Usmrtenie, pitva a fixácia tkaniva

Ciele:

1. Umožniť humánne usmrtenie rýb.

2. Získať potrebné telesné miery a hmotnosť.

3. Vyhodnotiť sekundárne pohlavné znaky.

4. Narezať tkanivá na analýzu VTG.

5. Zafixovať gonády.

Postupy:

1. Ryby by sa mali usmrtiť bezprostredne pred pitvou. Preto by sa naraz nemalo usmrcovať viacero rýb, pokiaľ nie je k dispozícii viacero prosektorov.

2. Ryba sa pomocou malej ponornej siete vyberie z pokusnej komory a v prepravnej nádobe prenesie na miesto pitvy.

3. Ryba sa umiestni do usmrcovacieho roztoku. Keď sa rybe zastaví dýchanie a prestane reagovať na vonkajšie podnety, vyberie sa z roztoku.

4. Odváži sa mokrá hmotnosť ryby.

5. Na prípravu tkanív na analýzu VTG sa ryba môže umiestniť na korkovú dosku na stolík disekčného mikroskopu.

   a) V prípade dánia pruhovaného sa hlava odreže bezprostredne za prsnou plutvou a chvost bezprostredne za chrbtovou plutvou.

   b) V prípade medaky japonskej sa brucho otvorí opatrne vedeným rezom po ventrálnej stredovej čiare od hrudného pletenca po bod tesne kraniálne od análneho otvoru. Pečeň sa opatrne vyberie pomocou malej pinzety a malých nožníc.

6. Vzorky na analýzu VTG sa umiestnia do Eppendorfových skúmaviek a ihneď sa zmrazia v tekutom dusíku.

7. Mŕtvy živočích vrátane gonád sa umiestni do označenej plastovej kazety na tkanivá, ktorá sa prenesie do Davidsonovho alebo Bouinovho fixačného prostriedku. Objem fixačného prostriedku by mal byť aspoň desaťnásobkom približného objemu tkanív. Fixačná nádoba sa jemne premiešava päť sekúnd, aby sa z kazety uvoľnili vzduchové bubliny.

8. a. Všetky tkanivá zostanú cez noc v Davidsonovom fixačnom prostriedku a nasledujúci deň sa prenesú do samostatných nádob s 10 % neutrálnym tlmeným formalínom. Nádoby s kazetami sa jemne premiešavajú 5 sekúnd, aby sa zabezpečil dostatočný prienik formalínu do kaziet.

▼M6

b. Tkanivá zostanú 24 hodín v Bouinovom fixačnom prostriedku a potom sa prenesú do 70 % etanolu.

Spracovanie tkanív

Ciele:

1. Dehydratovať tkanivo tak, aby sa zabezpečil dostatočný prienik parafínu.

2. Impregnovať tkanivo parafínom, aby sa zachovala celistvosť tkanív a vytvoril pevný povrch umožňujúci mikrotómiu.

Postupy:

3. Označené kazety s tkanivami sa vyberú z formalínu/etanolu a umiestnia do spracovacieho koša (spracovacích košov). Spracovací kôš sa vloží do prístroja na spracovanie tkaniva.

4. Zvolí sa harmonogram spracovania.

5. Po tom, ako prístroj na spracovanie tkaniva dokončil spracovací cyklus, kôš/koše sa môže/môžu preniesť do zalievacieho zariadenia.

Zalievanie

Cieľ:

Správne umiestniť vzorku do stuhnutého parafínu na účely mikrotómie.

Postupy:

1. Koše s kazetami sa vyberú z prístroja na spracovanie tkaniva a ponoria do prednej komory tepelnej konzoly zalievacieho zariadenia naplnenej parafínom alebo sa kazety prenesú do samostatného parafínového ohrievača.

2. Prvá kazeta, ktorá sa má zaliať, sa vyberie z prednej komory tepelnej konzoly alebo parafínového ohrievača. Kryt kazety sa odstráni a zlikviduje a označenie kazety sa porovná so záznamami o živočíchovi, aby sa pred zaliatím vyriešili prípadné nezrovnalosti.

3. Vyberie sa zalievacia forma vhodnej veľkosti.

4. Forma sa podrží pod výpustom dávkovacej konzoly a naplní roztaveným parafínom.

5. Vzorka sa vyberie z kazety a umiestni do roztaveného parafínu vo forme. To sa zopakuje so štyrmi až ôsmimi vzorkami pre každú parafínovú formu. Pozícia jednotlivých rýb sa označí tak, že ryba č. 1 sa natočí do 180 stupňov vzhľadom na ryby 2 – 4/8.

6. Pridá sa ďalší parafín na prekrytie vzorky.

7. Forma s kazetovou základňou sa umiestni na chladiacu platňu kryokonzoly.

8. Po stuhnutí parafínu sa blok (t. j. stvrdnutý parafín obsahujúci tkanivá a kazetovú základňu) vyberie z formy.

Mikrotómia

Cieľ:

Narezať a upevniť histologické rezy na účely farbenia.

Postupy:

1. Prvá fáza mikrotómie označovaná ako „približovanie“ (facing) sa vykonáva takto:

   a) Parafínový blok sa umiestni do skľučovadla mikrotómu.

   b) Skľučovadlo sa posúva otáčaním kolieska mikrotómu, pričom sa z parafínového povrchu bloku odrezávajú hrubé rezy, kým nôž nedosiahne zaliate tkanivá.

▼M6

c) Hrúbka rezu na mikrotóme sa nastaví na 3 – 5 mikrónov. Skľučovadlo sa posúva a z bloku sa odrežú viaceré rezy, aby sa odstránili prípadné artefakty vytvorené na reznom povrchu tkaniva pri hrubom rezaní.

d) Blok možno vybrať zo skľučovadla a položiť prednou stranou nadol na ľad, aby tkanivo nasiaklo.

2. Ďalšou fázou mikrotómie je konečné rezanie a pripevnenie rezov tkaniva na podložné sklíčka. Tieto postupy sa vykonávajú takto:

a) Ak bol blok uložený na ľade, sníme sa z ľadu a znova sa vloží do skľučovadla mikrotómu.

b) Hrúbka rezu na mikrotóme sa nastaví na 3 – 5 mikrónov a skľučovadlo sa posúva otáčaním kolieska mikrotómu. Z bloku sa odrezávajú rezy, kým sa nevytvorí „prúžok“ obsahujúci aspoň jeden prijateľný rez s gonádami. (Podľa potreby možno počas rezania blok vybrať zo skľučovadla, položiť na ľad, aby tkanivo nasiaklo, a znova vložiť do skľučovadla.)

c) Rezy sa vodorovne uložia na povrch vody vo vodnom kúpeli. Ideálne je získať aspoň jeden rez bez záhybov a zachytených vzduchových bublín na spodku.

d) Pod najlepší rez sa ponorí podložné mikroskopické sklíčko, pomocou ktorého sa rez vyberie z vody. Tento proces sa označuje ako „pripevňovanie“ rezu na podložné sklíčko.

e) Pre každý súbor rýb sa pripravia tri rezy. Druhý a tretí rez sa urobia v odstupoch 50 mikrónov od prvého rezu. Ak sú ryby zaliate tak, že ich gonády nie sú v rovnakej úrovni rezu, treba urobiť viac rezov, aby sa z každej ryby získalo aspoň šesť rezov s gonádami.

f) Perom na označovanie podložných sklíčok sa na sklíčko napíše číslo bloku, z ktorého sa podložné sklíčko vyrobilo.

g) Podložné sklíčko sa umiestni do farbiaceho stojana.

h) Blok sa vyberie zo skľučovadla a položí prednou stranou nadol na účely skladovania.

Farbenie, zakrytie krycím sklíčkom a označenie podložného sklíčka

Ciele:

— Zafarbiť rezy na histopatologické vyšetrenie.

— Trvalo zakryť pripevnené a zafarbené tkanivá.

— Trvalo identifikovať zafarbené rezy spôsobom, ktorý umožňuje úplnú vysledovateľnosť.

Postupy:

1. Farbenie

a) Pred farbením sa podložné sklíčka cez noc vysušia vzduchom.

b) Rezy sa zafarbia hematoxylín-eozínom.

2. Zakrytie krycím sklíčkom

a) Krycie sklíčka možno uložiť ručne alebo automaticky.

b) Podložné sklíčko sa ponorí do xylénu alebo prostriedku TissueClear. Nadbytočné množstvo xylénu/prostriedku TissueClear sa opatrne strasie z podložného sklíčka.

▼**M6**

c) Približne 0,1 ml upevňovacieho média sa aplikuje do blízkosti konca podložného sklíčka oproti matnému koncu alebo na krycie sklíčko.

d) Pri ukladaní na podložné sklíčko sa krycie sklíčko nakloní pod ostrým uhlom.

3. Označovanie

a) Každé označenie podložného sklíčka by malo obsahovať tieto informácie.

i) Názov laboratória

ii) Druh

iii) Č. vzorky/č. sklíčka

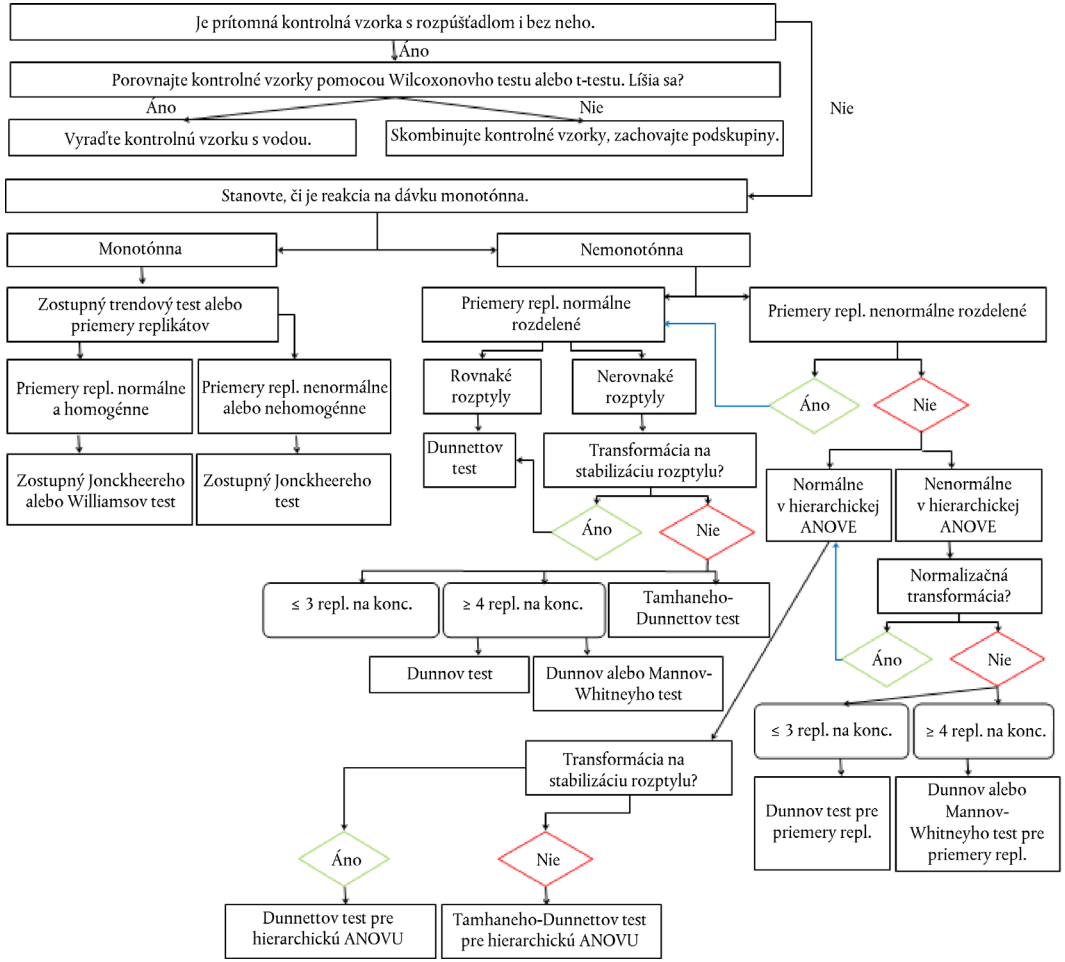
iv) Chemikália/skupina s danou koncentráciou

v) Dátum

▼M6

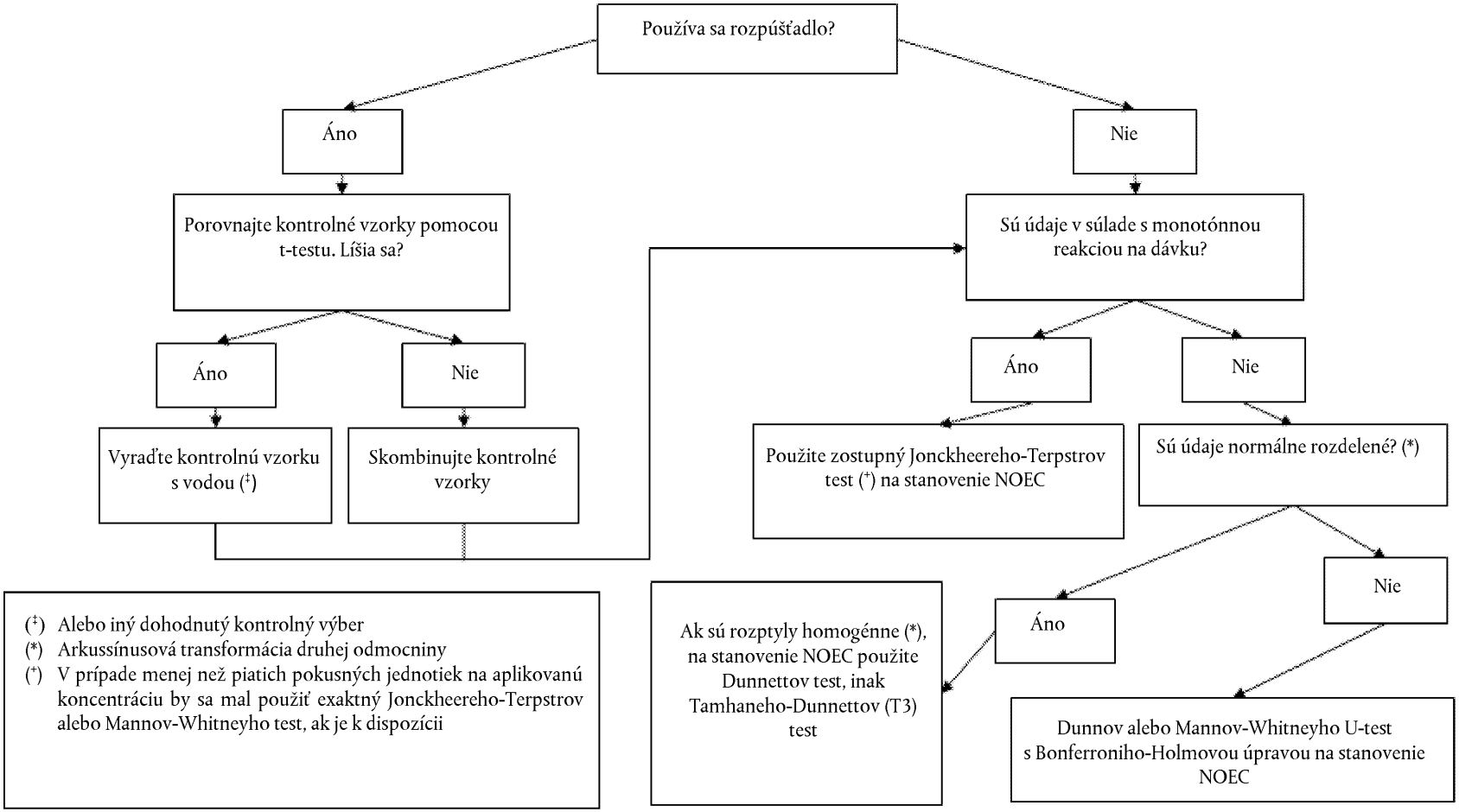
Dodatok 8

Štatistická schéma pre analýzu vitellogenínu



▼M6

Štatistická schéma pre analýzu pomeru pohlaví



s

▼M6

Dodatok 9

Usmernenie na odber vzoriek tkanív na účely určenia genetického pohlavia a na účely určenia genetického pohlavia metódou PCR

Odber vzoriek tkanív, ich príprava a skladovanie pred určením genetického pohlavia metódou PCR pri medake (pripravené Laboratóriom pre vodné organizmy spoločnosti Bayer CropScience AG)

1. Jemnými nožnicami sa odstrihne análna alebo chrbtová plutva každej jednotlivej ryby a umiestni sa do skúmavky naplnenej 100 µl extrakčného tlmivého roztoku 1 (podrobnosti o príprave tlmivého roztoku nájdete ďalej). Nožnice sa po každej rybe vyčistia v kadičke naplnenej destilovanou vodou a usušia papierovou vreckovkou.

2. Tkanivá z plutiev sa následne homogenizujú mikrotrubičkovým teflónovým piestikom, aby sa dosiahla lýza buniek. Pre každú skúmavku sa použije nový piestik, aby nedošlo ku kontaminácii. Piestiky sa cez noc umiestnia do 0,5 M NaOH, 5 minút sa oplachujú v destilovanej vode a až do ich použitia sa skladujú v etanole alebo sterilnom prostredí po sterilizácii v autokláve.

3. Tkanivo z plutvy možno skladovať aj bez extrakčného tlmivého roztoku 1 na suchom ľade a potom v chladničke pri teplote – 80 °C, aby nedošlo k degenerácii DNA. Extrakcia však funguje lepšie, ak sa zároveň extrahuje DNA (pokyny na manipuláciu sú uvedené vyššie, vzorky sa po skladovaní pri teplote – 80 °C majú pred naplnením tlmivého roztoku do skúmaviek rozmraziť na ľade).

4. Po homogenizácii sa všetky skúmavky umiestnia do vodného kúpeľa a varia 15 minút pri teplote 100 °C.

5. Potom sa do každej skúmavky pipetou pridá 100 µl extrakčného tlmivého roztoku 2 (podrobnosti o príprave tlmivého roztoku nájdete ďalej). Vzorky sa 15 minút skladujú pri izbovej teplote a v priebehu skladovania sa občas jemne pretrepú rukou.

6. Potom sa všetky skúmavky znova umiestnia do vodného kúpeľa a varia 15 minút pri teplote 100 °C.

7. Až do ďalšej analýzy sa skúmavky zmrazia na teplotu – 20 °C.

Príprava tlmivého roztoku

Tlmivý roztok na PCR 1:

500 mg N-lauroylsarkozínu (napr. Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko),

2 ml 5 M NaCl,

pridajte 100 ml dest. H_2O

→ sterilizujte v autokláve.

Tlmivý roztok na PCR 2:

20 g Chelex (napr. Biorad, Mníchov, Nemecko),

nechajte nasiaknuť v 100 ml dest. H_2O

→ sterilizujte v autokláve.

Určenie genetického pohlavia metódou PCR pri medake (pripravené Laboratóriom pre vodné organizmy spoločnosti Bayer CropScience AG a centrom Universität Würzburg Biozentrum)

Pripravené a zmrazené skúmavky (opísané v predchádzajúcom oddiele) sa rozmrazia na ľade. Potom sa odstredia s použitím Eppendorfovej odstredivky (30 s pri max. rýchlosti pri izbovej teplote). Na analýzu PCR sa použije čistý supernatant oddelený od zrazeniny. Je bezpodmienečne nevyhnutné zabrániť tomu, aby sa akékoľvek stopy látky Chelex (nachádzajúce sa na zrazenine) preniesli do reakcie PCR, lebo to naruší pôsobenie „Taq“-polymerázy. Supernatant sa použije priamo alebo sa môže skladovať zmrazený (– 20 C) a na účely ďalších analýz sa môže znova rozmraziť vo viacerých cykloch bez toho, aby to malo negatívny vplyv na DNA.

▼**M6**

1. *Príprava „reakčnej zmesi“ (25 µl na vzorku):*

	Objem	Konečná koncentrácia
Templátová DNA	0,5 µl – 2 µl	
10 × tlmivý roztok na PCR s $MgCl_2$	2,5 µl	1x
Nukleotidy (každý spomedzi dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 mM)	200 µM
Priamy primer (10 µM) (pozri ďalej 3 – 5)	0,5 µl	200 nM
Reverzný primer (10 µM) (pozri ďalej 3 – 5)	0,5 µl	200 nM
DMSO	1,25 µl	5 %
Voda (kvalita na PCR)	do 25 µl	
Taq E-polymeráza	0,3 µl	1,5 U
10 × tlmivý roztok na PCR s $MgCl_2$: 670 mM Tris/HCl (pH 8,8 pri 25 °C), 160 mM $(NH_4)_2SO_4$, 25 mM $MgCl_2$, 0,1 % Tween 20		

Na každú analýzu PCR (pozri ďalej 3 – 5) je potrebný špeciálny primer ako nová kombinácia „reakčnej zmesi“ a primeraného potrebného množstva templátovej DNA pre každú vzorku (pozri vyššie). Príslušné objemy sa pipetami prenesú do nových skúmaviek. Potom sa všetky skúmavky uzavrú, premiešajú (približne 10 s) a odstredia (10 s pri izbovej teplote). Teraz možno spustiť príslušné programy PCR. Okrem toho sa v každom programe PCR použije pozitívna kontrolná vzorka (exemplárna vzorka DNA so známym pôsobením a jasnými výsledkami) a negatívna kontrolná vzorka (1 µl dest. vody).

2. *Príprava agarózového gélu (1 %) – počas vykonávania programov PCR:*

— Rozpustite 3 g agarózy v 300 ml tlmivého roztoku 1 × TAE (1 % agarózový gél).

— Tento roztok sa musí povariť v mikrovlnnej rúre (približne 2 – 3 min.).

— Preneste horúci roztok do špeciálnej odlievacej schránky, ktorá leží na ľade.

— Po približne 20 min. je agarózový gél pripravený na použitie.

— Agarózový gél skladujte v tlmivom roztoku 1 × TAE až do konca programov PCR.

3. *Aktínový program PCR:*

Účelom tejto reakcie PCR je preukázať, že DNA vo vzorke nie je poškodená.

— Špeciálny primer:

„Mact1(horný/priamy)“ → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

„Mact2(spodný/reverzný)“ → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Program:

5 min. pri 95 °C

Cyklus (35-krát):

Denaturácia → 45 s pri 95 °C

Teplotná hybridizácia → 45 s pri 56 °C

Elongácia → 1 min. pri 68 °C

15 min. pri 68 C

▼M6

4. *Program PCR na detekciu génov na chromozómoch X a Y*

V tomto programe PCR sa vzorky neporušenej DNA použijú na detekciu génov na chromozómoch X a Y. V samčej DNA by sa mal ukázať jeden dvojitý pás a v samičej DNA jeden jednotlivý pás (po zafarbení a gélovej elektroforéze). V tomto programe by sa mala analyzovať aj jedna pozitívna kontrolná vzorka pre samčekov (vzorka XY) a jedna pre samičky (vzorka XX).

— Špeciálny primer:

„PG 17.5“ (horný/priamy) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

„PG 17.6“ (dolný/reverzný) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Program:

5 min. pri 95 °C

Cyklus (40-krát):

Denaturácia	→ 45 s pri 95 °C
Teplotná hybridizácia	→ 45 s pri 55 °C
Elongácia	→ 1 min. 30 s pri 68 °C

15 min. pri 68 °C

5. *Program PCR na detekciu génov na chromozóme Y ako „kontrola“ pre program PCR na detekciu génov na chromozómoch X a Y*

Pomocou tohto programu PCR sa overujú výsledky programu PCR na detekciu génov na chromozómoch X a Y. Na samčích vzorkách by sa mal ukázať jeden pás a na samičích vzorkách by sa nemal ukázať žiadny pás (po zafarbení a gélovej elektroforéze).

— Špeciálny primer:

„DMTYa (horný/priamy)“ → GGC CGG GTC CCC GGG TG

„DMTYd (dolný/reverzný)“ → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Program:

5 min. pri 95 °C

Cyklus (40-krát):

Denaturácia	→ 45 s pri 95 °C
Teplotná hybridizácia	→ 45 s pri 56 °C
Elongácia	→ 1 min. pri 68 °C

15 min. pri 68 °C

6. *Farbenie vzoriek PCR:*

Farbiaci roztok:

50 % glycerol

100 mM EDTA

1 % SDS

0,25 % brómfenolová modrá

0,25 % xylén kyanol

Pipetou aplikujte 1 µl farbiaceho roztoku do každej skúmavky.

7. *Spustenie gélovej elektroforézy:*

— Pripravený 1 % agarózový gél sa prenesie do komory na gélovú elektroforézu naplnenej tlmivým roztokom 1 × TAE.

— 10 – 15 µl z každej zafarbenej vzorky PCR sa pipetou nanesie na príslušné miesto na agarózovom géle.

— Na samostatné miesto sa pipetou nanesie 5 – 15 µl roztoku 1kb-„Ladder“(Invitrogen).

— Spustite elektroforézu pri 200 V.

— Po 30 – 45 minútach ju zastavte.

▼**M6**

8. *Určenie pásov:*

— Vyčistite agarózový gél v destilovanej vode.

— Následne preneste agarózový gél do ethídiumbromidu na 15 – 30 minút.

— Potom sa má urobiť snímka agarózového gélu v UV svetelnej komore.

— Vzorky sa napokon analyzujú porovnaním s pozitívnym kontrolným pásom (alebo pásmi) a rebríkom („ladder“).

▼M6

Dodatok 10

Usmernenie na odber vzoriek tkanív na účely určenia genetického pohlavia metódou pcr pri pichľavke sivej

Odber vzoriek tkanív a extrakcia DNA

DNA možno extrahovať pomocou rôznych komerčne dostupných reaktantov a manuálnych i automatizovaných extrakčných systémov. Ďalej je opísaný protokol používaný v laboratóriu Cefas Weymouth a podľa potreby sú uvedené aj alternatívne prístupy.

1. Pomocou jemných nožníc sa z každej ryby oddelí malá časť tkaniva (10 – 20 mg) z dorzolaterálnej oblasti (po odstránení hlavy a chvosta na analýzu VTG). Tkanivo sa vloží do skúmavky a buď sa priamo umiestni do tekutého dusíka (na účely skladovania pri teplote – 80 °C), alebo sa skúmavka naplní 70 % etanolom (na účely prepravy a následného skladovania pri teplote – 4 °C). Nožnice sa po každej rybe vyčistia v 70 % etanole a potom v destilovanej vode a usušia papierovou vreckovkou.

2. Etanol (ak je prítomný) sa odstráni odsatím a tkanivo sa nechá cez noc digerovať proteinázou K v 400 µl tlmivého roztoku ATL (Qiagen). Alikvotná časť (200 µl) digerovaného tkaniva sa prenesie na 96-jamkový S-blok (Qiagen) a DNA sa vyextrahuje v 96-jamkovom formáte pomocou systému Qiagen Universal BioRobot a súpravy QIamp Investigator BioRobot Kit. DNA sa eluuje v 50 µl vody bez DNázy a RNázy. Ak sa na extrakciu DNA používajú tvrdé tkanivá (napr. chrbtica alebo prsná plutva), môže byť potrebné homogenizovať vzorku v lyzačnom tlmivom roztoku pomocou nástroja na lýzu tkaniva FastPrep® alebo ekvivalentného systému na disrupciu tkaniva.

   Alternatíva:

   a) Tkanivo sa nechá cez noc digerovať proteinázou K v 400 µl lyzačného tlmivého roztoku G2 (Qiagen). DNA sa vyextrahuje z 200 µl digerovaného tkaniva buď pomocou súpravy EZ-1 DNA Easy Tissue Kit a systému EZ-1 Biorobot, alebo pomocou súpravy DNA Easy Tissue Mini Kit. DNA sa eluuje v objeme 50 µl.

   b) Tkanivá sa spracujú pomocou reaktanta DNAzol. Vzorky tkaniva sa 10 minút lyzujú v 1 ml DNAzolu v 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavke a potom sa odstreďujú pri 13 000 ot./min. počas 5 minút, aby sa odstránili všetky tuhé častice. Lyzovaná vzorka sa následne prenesie do novej 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky obsahujúcej 500 µl 100 % etanolu v kvalite vhodnej na molekulárne analýzy a potom sa odstreďuje pri 13 000 ot./min. počas 10 minút, aby sa vyzrážala DNA. Etanol sa odstráni a nahradí 400 µl 70 % etanolu v kvalite vhodnej na molekulárne analýzy, vzorka sa odstreďuje pri 13 000 ot./min. počas 5 minút a peleta DNA sa rozpustí v 50 µl vody bez DNázy a RNázy vhodnej na molekulárne analýzy. Znova platí, že ak sa používajú tvrdé tkanivá (prsná plutva), pred extrakciou DNA môže byť potrebné homogenizovať vzorku v lyzačnom tlmivom roztoku pomocou nástroja na lýzu tkaniva FastPrep® alebo ekvivalentného systému na disrupciu tkaniva.

3. DNA sa až do použitia skladuje pri teplote – 20 °C.*Dôležitá poznámka:* počas postupov sa musia používať rukavice.

Analýza pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR)

Vykonajú sa amplifikácie pomocou 2,5 µl extraktu DNA v reakčnom objeme 50 µl pomocou primerov pre lokus Idh (opis: Peichel a kol., 2004. Current Biology 1:1416 – 1424):

Priamy primer	5′ GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3′
Reverzný primer	5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

▼**M6**

Vhodné reaktanty na PCR dodávajú mnohí dodávatelia. Metóda uvedená ďalej sa v súčasnosti používa v laboratóriu Cefas Weymouth.

1. *Príprava „reakčnej zmesi“ (50 µl na vzorku):*

Ďalej je opísaný spôsob prípravy hlavnej zmesi. Možno ju pripraviť vopred a skladovať zmrazenú pri teplote – 20 °C až do použitia. Pripravte dostatočné množstvo hlavnej zmesi na negatívnu kontrolnú vzorku (len s použitím vody v kvalite vhodnej na molekulárne biologické analýzy).

	Objem (zásobný konc.)/ vzorku	Konečná koncentrácia
Reakčný tlmivý roztok 5xGo-Taq®	10 µl	1x
$MgCl_2$	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nukleotidy (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (každý 25 mM)	každý 250 µM
Priamy primer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Reverzný primer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Voda v kvalite vhodnej na molekulárne biologické analýzy	30,75 µl	
GoTaq-polymeráza	0,25 µl	1,25 U

— Pridajte 47,5 µl do označenej 0,5 ml tenkostennej skúmavky na PCR.

— Pridajte 2,5 µl purifikovanej DNA do príslušne označenej skúmavky. Zopakujte pre všetky vzorky a negatívnu kontrolnú vzorku.

— Prekryte dvoma kvapkami minerálneho oleja. Alternatívne možno použiť termocyklér s vyhrievaným krytom.

— Uzavrite kryty.

— Vzorky sa denaturovali v termocykléri Peltier PTC-225 pri teplote 94 C ± 2 °C počas 5 minút, potom nasledovalo 39 cyklov pri teplote 94 °C ± 2 °C počas 1 minúty, 55 °C ± 2 °C počas 1 minúty, 72 °C ± 2 C počas 1 minúty a záverečné predĺženie pri teplote 72 °C ± 2 C počas 10 minút.

2. *Príprava agarózového gélu (2 %):*

Tradične sa produkty PCR interpretujú na 20 % agarózovom géle obsahujúcom ethídiumbromid.

Možno použiť aj kapilárne elektroforetické systémy.

— Navážte 2 g agarózy do 100 ml tlmivého roztoku 1 × TAE.

— Zahrejte v mikrovlnnej rúre (približne 2 – 3 min.), aby sa agaróza rozpustila.

— Pridajte dve kvapky ethídiumbromidu s konečnou koncentráciou 0,5 µg/ml.

— Preneste horúci roztok do zariadenia na odlievanie gélu.

— Nechajte gél stvrdnúť.

3. *Gélová elektroforéza:*

— Preneste agarózový gél do zariadenia na elektroforézu a ponorte do tlmivého roztoku 1 × TAE.

— Pridajte 20 µl z každej vzorky do samostatnej jamky a do náhradnej jamky pridajte marker molekulovej hmotnosti (DNA rebrík 100bp, Promega).

— Elektroforéza sa vykonáva pri 120 V počas 30 – 45 minút.

▼**M6**

4. *Vizualizácia produktov amplifikácie*

Ak bol do agarózového gélu pridaný ehtídiumbromid podľa opisu uvedeného vyššie, produkty DNA sa vizualizujú pod zdrojom UV žiarenia. Alternatívne sa agarózový gél pred vizualizáciou zafarbí pokrytím gélu zriedeným roztokom ethídiumbromidu (0,5 μg/ml vo vode) na 30 minút.

▼M6

Dodatok 11

Usmernenie pre postup umelého oplodnenia pichľavky sivej

Účelom tohto oddielu je opísať postupy na získanie oplodnených vajíčok pichľavky sivej na použitie v teste FSDT.

Postupy

Získanie spermií od samčekov

1. Dobre sfarbený samček z požadovanej populácie sa usmrtí.

2. Z každej strany ryby sa odoberú semenníky. *Semenníky sú väčšinou výrazne pigmentované štruktúry tvaru tyče, ktoré sú dobre viditeľné v laterálnej stredovej línii tela*. Použite jednu z týchto metód:

3. Pomocou jemných nožníc urobte rez s dĺžkou 1 – 1,5 cm jedným strihnutím od kloaky v uhle približne 45 stupňov.

4. Skalpelom urobte malý rez na bočnej strane ryby mierne za panvou a mierne ventrálne od bočných štítkov.

5. Jemnou pinzetou vyberte semenníky a vložte ich do Petriho misky.

6. Každý semenník sa pokryje 100 µl čerstvo vyrobeného **Hankovho konečného roztoku** (*).

7. Semenníky sa nakrájajú na malé kocky pomocou žiletky alebo skalpela. Tým sa uvoľnia spermie a Hankov roztok získa mliečny vzhľad.

8. Tekutina obsahujúca spermie sa pridá do skúmavky, pričom treba dávať pozor, aby sa pri pipetovaní nedostali do skúmavky kúsky semenníkov.

9. Do skúmavky sa pridá 800 µl Hankovho konečného roztoku a dobre sa premieša.

10. Ak je to potrebné, samčeka možno zafixovať v 100 % etanole alebo inom požadovanom fixačnom prostriedku. To je dôležité najmä vtedy, keď sa v štúdii určuje rodičovský pôvod mláďat.

Dôležitá poznámka: *Hoci väčšinu potrebných zásobných roztokov možno pripraviť vopred*, ***zásobný roztok 5*** *a následne aj* ***konečný roztok*** *by sa mali pripraviť čerstvé v deň použitia*.

Zásobný roztok 1

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Destilovaná voda (DV)	100 ml

Zásobný roztok 2

Na_2HPO_4 (bezvodý)	0,358 g
KH_2PO_4	0,60 g
DV	100 ml

Zásobný roztok 3

$CaCl_2$	0,72 g
DV	50 ml

(*) Hankov tlmený soľný roztok (HBSS):

Roztok HBSS je potrebný na uchovanie spermií počas prípravy na oplodnenie.

▼**M6**

Zásobný roztok 4

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,23 g
DV	50 ml

Zásobný roztok 5 (čerstvo pripravený)

$NaHCO_3$	0,35 g
DV	10 ml

Poznámka: Ak už máte pripravené niektoré z uvedených solí, ale s iným obsahom vody (t. j. $2H_2O$ namiesto bezvodých), môžete ich použiť, najskôr však upravte hmotnosť na základe molekulovej hmotnosti.

V prípade Hankovho konečného roztoku ich kombinujte v tomto poradí:

zásobný roztok 1	1,0 ml
zásobný roztok 2	0,1 ml
zásobný roztok 3	0,1 ml
DV	8,6 ml
zásobný roztok 4	0,1 ml
zásobný roztok 5	0,1 ml

Pred použitím dobre premiešajte.

Oplodnenie

1. V požadovanej populácii sa identifikujú veľké gravidné samičky. Samičky sú pripravené na vytláčanie až vtedy, keď vidíte vajíčka vyčnievať z kloaky. Pripravené samičky majú typickú polohu „hlava hore“.

2. Jemne prejdite prstom alebo palcom po bočnej strane ryby smerom k chvostu, aby ste podporili vypudenie vačku s vajíčkami do novej Petriho misky. Zopakujte to aj na druhej strane a vráťte rybu do nádrže.

3. Vajíčka možno rozptýliť (aby tvorili jednu vrstvu) pomocou jemného štetca. Je dôležité snažiť sa vystaviť spermiám čo najviac vajíčok, preto je užitočné maximalizovať povrchovú plochu vajíčok. Dôležitá poznámka: Uchovávajte vajíčka vlhké tak, že okolo nich uložíte vlhkú vreckovku (je dôležité, aby sa vajíčka priamo nedotýkali vody, lebo to môže viesť k predčasnému stvrdnutiu choriónu, čím by sa znemožnilo oplodnenie). Existujú veľké rozdiely v počte vajíčok, ktoré sú jednotlivé samičky schopné vytvoriť, ale v priemere možno z jednej gravidnej samičky ľahko získať približne 150 vajíčok.

4. 25 µl spermií v Hankovej zmesi sa štetcom rovnomerne rozotrie na celý povrch vajíčok. Vajíčka po začiatku oplodňovania rýchlo stvrdnú a zmenia farbu (do minúty). Ak je odhadovaný počet vajíčok vyšší ako 150, postup zopakujte. Podobne ak vajíčka nestvrdnú do jednej minúty, pridajte trochu viac spermií. Dôležitá poznámka: Pridaním väčšieho množstva spermií sa nemusí nevyhnutne zvýšiť miera oplodnenia.

5. Vajíčka a roztok spermií by sa mali nechať „interagovať“ aspoň 15 minút a oplodnené vajíčka by sa mali umiestniť do expozičných akvárií do 1,5 hodiny od oplodnenia.

6. Postup sa opakuje s použitím ďalšej samičky, kým sa nezíska želaný počet vajíčok.

7. Odložte si niekoľko vajíčok z poslednej dávky a zafixujte ich v 10 % kyseline octovej.

▼M6

Počítanie a rozdelenie vajíčok do testovacích akvárií

1. Vajíčka by sa mali rovnomerne rozdeliť medzi jednotlivé úrovne koncentrácie chemikálie, aby sa zabránilo genetickému skresleniu. Každá dávka oplodnených vajíčok by sa mala rozdeliť na skupiny rovnakej veľkosti (v rovnakom počte ako úrovne koncentrácie chemikálie) pomocou tupého nástroja (t. j. entomologickej pinzety s tupou čepeľou alebo inokulačnej kľučky). Ak chcete použiť štyri replikáty na testovanú koncentráciu po 20 vajíčkach, musíte do každého expozičného akvária umiestniť 80 vajíčok. Dôležitá poznámka: Odporúča sa pridať ďalších 20 % (t. j. celkovo 96 vajíčok na úroveň koncentrácie chemikálie), aby ste si boli istí, že dosiahnete 100 % mieru oplodnenia.

2. Vajíčka pichľavky sú mimo hniezda stráženého otcom veľmi náchylné na plesňové infekcie. V tejto súvislosti má rozhodujúci význam ošetrovanie všetkých vajíčok metylénovou modrou počas prvých piatich dní testu. Zásobný roztok metylénovej modrej sa pripraví v koncentrácii 1 mg/ml a pridá sa do expozičných akvárií, aby sa dosiahla maximálna konečná koncentrácia 2,125 mg/l. Dôležitá poznámka: Pichľavky by sa po vyliahnutí nemali vystavovať metylénovej modrej, takže v 6. deň by ju systém už nemal obsahovať.

3. Vajíčka sa každý deň kontrolujú a všetky mŕtve alebo neoplodnené vajíčka sa zaznamenajú. Dôležitá poznámka: Vajíčka sa až do vyliahnutia nikdy nesmú dostať mimo vodu, a to ani na veľmi krátke obdobie.

▼M6

C.42. BIODEGRADOVATEĽNOSŤ V MORSKEJ VODE

VŠEOBECNÝ ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 306 (1992). Keď sa vyvíjali pôvodné testovacie metódy, nebolo známe, do akej miery možno výsledky skríningových testov ľahkej biodegradovateľnosti s použitím pitnej vody a výtoku splaškových vôd alebo aktivovaného kalu ako inokula uplatniť v morskom prostredí. V tejto súvislosti sa získali rôznorodé výsledky [napr. (1)].

2. Mnohé priemyselné odpadové vody obsahujúce rôzne chemikálie sa dostávajú do mora buď priamym vypúšťaním, alebo prostredníctvom ústí riek, v ktorých je čas zotrvania nízky v porovnaní s časom potrebným na úplnú biodegradáciu mnohých chemických látok. Vzhľadom na rastúcu informovanosť o potrebe chrániť morské prostredie pred zvyšovaním chemickej záťaže a o potrebe odhadnúť pravdepodobnú koncentráciu chemikálií v mori sa vyvinuli testovacie metódy týkajúce sa biodegradovateľnosti v morskej vode.

3. Opísané metódy využívajú prírodnú morskú vodu ako vodnú fázu aj ako zdroj mikroorganizmov. V snahe dosiahnuť súlad s metódami stanovenia ľahkej biodegradovateľnosti v sladkej vode sa skúmalo použitie ultrafiltrovanej a odstredenej morskej vody, ako aj použitie morských sedimentov ako inokula. Tieto skúmania boli neúspešné. Testovacím médiom je teda prírodná morská voda, ktorá sa predupravila odstránením hrubých častíc.

4. Na posúdenie úplnej biodegradovateľnosti metódou trepačkovej banky je nutné použiť pomerne vysoké koncentrácie testovanej látky vzhľadom na nízku citlivosť analytickej metódy využívajúcej rozpustený organický uhlík (DOC). To si následne vyžaduje, aby sa do morskej pridali minerálne živiny (N a P), ktorých nízke koncentrácie by inak obmedzili elimináciu DOC. Živiny sa musia pridať aj v prípade metódy uzavretej fľaše z dôvodu koncentrácie pridanej testovanej látky.

5. Z toho vyplýva, že metódy nie sú testy ľahkej biodegradovateľnosti, lebo okrem mikroorganizmov, ktoré sú už prítomné v morskej vode, sa nepridáva žiadne inokulum. Testy ani nesimulujú morské prostredie, lebo sa pridávajú živiny a koncentrácia testovanej látky je oveľa vyššia, ako by bola v mori. Z týchto dôvodov sa metódy uvádzajú v novom pododdiele s názvom „Biodegradovateľnosť v morskej vode“.

UPLATŇOVANIE

6. Prvé informácie o biodegradovateľnosti v morskej vode poskytujú výsledky testov, ktoré by sa použili v prípade, keď model používania a likvidácie predmetnej látky nasvedčuje dráhe do mora. Ak je výsledok kladný (> 70 % eliminácia DOC, > 60 % ThOD – teoretická spotreba kyslíka), možno dospieť k záveru, že existuje potenciál pre biodegradáciu v morskom prostredí. Záporný výsledok však nevylučuje tento potenciál, ale naznačuje, že je potrebná ďalšia štúdia, napríklad s použitím čo najnižšej koncentrácie testovanej látky.

▼M6

7. V každom prípade, ak sa vyžaduje presnejšia hodnota miery alebo stupňa biodegradácie v morskej vode na konkrétnom mieste, je nutné použiť ďalšie zložitejšie a dokonalejšie, a teda aj nákladnejšie metódy. Napríklad by bolo možné použiť simulačný test s použitím koncentrácie testovanej látky bližšej predpokladanej koncentrácii v životnom prostredí. Takisto je možné použiť neobohatenú a nepredupravenú morskú vodu z miesta záujmu a po primárnej biodegradácii sa môže vykonať špecifická chemická analýza. Na stanovenie úplnej biodegradovateľnosti by bolo potrebné použiť látky označené uhlíkom ^{14}C, aby bolo možné odmerať mieru zániku rozpustného organického uhlíka ^{14}C a produkciu $^{14}CO_2$ v realistických koncentráciách v životnom prostredí.

VÝBER METÓD

8. Výber použitej metódy závisí od viacerých faktorov. Ako pomôcku pri výbere možno použiť nasledujúcu tabuľku. Látky s rozpustnosťou vo vode nižšou ako ekvivalent približne 5 mg C/l síce nemožno testovať metódou trepačkovej banky, ale v zásade možno tieto slabo rozpustné látky testovať aspoň metódou uzavretej fľaše.

Tabuľka

Výhody a nevýhody testu trepačkovej banky a testu uzavretej fľaše

METÓDA	VÝHODY	NEVÝHODY
TREPAČKOVÁ BANKA	— jednoduché prístroje okrem analyzátora C — dĺžka trvania 60 dní nie je problém — žiadny vplyv nitrifikácie — možno upraviť pre prchavé látky	— potreba analyzátora C — využíva 5 – 40 mg DOC/1, môže mať inhibujúce účinky — stanovenie DOC je ťažké pri nízkych koncentráciách v morskej vode (chloridový efekt) — koncentrácia DOC v morskej vode je niekedy vysoká
UZAVRETÁ FĽAŠA	— jednoduché prístroje — jednoduché konečné stanovenie — použitie nízkej koncentrácie testovanej látky (2 mg/l), takže menšie riziko inhibície — ľahko upraviteľné pre prchavé látky	— môže byť ťažké zachovať vzduchotesnosť fliaš — rast baktérií na stenách môže viesť k nesprávnym hodnotám — hodnoty spotreby O_2 v slepých vzorkách môžu byť vysoké najmä po 28 dňoch, čo možno prekonať zrením morskej vody — možný vplyv spotreby O_2 nitrifikáciou

METÓDA TREPAČKOVEJ BANKY

ÚVOD

1. Táto metóda je variantom modifikovaného skríningového testu OECD opísaného v kapitole C.4 B tejto prílohy (2), v ktorom sa používa morská voda. Vypracovala sa na základe kruhového testu, ktorý pre Európsku komisiu (EK) uskutočnil dánsky Ústav pre kvalitu vody (3).

2. Tak ako v prípade sprievodnej metódy uzavretej fľaše pre morskú vodu, výsledky tohto testu sa nepovažujú za ukazovatele ľahkej biodegradovateľnosti, ale majú sa použiť najmä na získanie informácií o biodegradovateľnosti látok v morskom prostredí.

▼**M6**

PRINCÍP METÓDY

3. Vopred stanovené množstvo testovanej látky sa rozpustí v testovacom médiu, aby sa získala koncentrácia 5 – 40 mg rozpusteného organického uhlíka (DOC)/l. Ak sa limity citlivosti analýz organického uhlíka zlepšia, môže byť výhodné použiť nižšie koncentrácie testovanej látky, najmä v prípade inhibujúcich látok. Roztok testovanej látky v testovacom médiu sa inkubuje za pretrepávania v tme alebo pri difúznom osvetlení v aeróbnych podmienkach pri stabilnej teplote (regulovanej na ± 2 °C), ktorá zvyčajne bude v rozsahu 15 – 20 °C. V prípadoch, keď je cieľom štúdie simulovať situácie v životnom prostredí, sa testy môžu uskutočniť aj mimo tohto zvyčajného rozsahu teplôt. Odporúčaná maximálna dĺžka trvania testu je približne 60 dní. Po degradácii nasledujú merania DOC (úplná degradácia) a v niektorých prípadoch aj špecifická analýza (primárna degradácia).

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

4. Na to, aby bolo možné určiť, či sa test môže použiť na konkrétnu látku, musia byť známe niektoré jej vlastnosti. Musí sa stanoviť obsah organického uhlíka látky, jej prchavosť musí byť taká, aby v priebehu testu nedochádzalo k významným stratám, a jej rozpustnosť vo vode musí byť vyššia ako ekvivalent 25 – 40 mg C/l. Testovaná látka by sa navyše nemala výrazne adsorbovať na sklenené povrchy. Potrebné sú informácie o čistote alebo pomernom zastúpení hlavných zložiek testovanej látky, aby bolo možné interpretovať získané výsledky, a to najmä v prípade, že výsledok je blízko „úspešnej“ úrovne.

5. Informácie o toxicite testovanej látky pre baktérie, napríklad údaje namerané v krátkodobých testoch rýchlosti spotreby kyslíka (4), môžu byť užitočné pri výbere vhodných testovaných koncentrácií a môžu byť rozhodujúce pre správnu interpretáciu nízkych hodnôt biodegradácie. Tieto informácie však nie sú vždy dostatočné na interpretáciu výsledkov získaných v teste na biologickú odbúrateľnosť a vhodnejší je postup opísaný v bode 18.

REFERENČNÉ LÁTKY

6. Na kontrolu mikrobiálnej činnosti vo vzorke morskej vody sa musia použiť vhodné referenčné látky. Príkladmi látok, ktoré možno použiť na tieto účely, sú benzoan sodný, octan sodný a anilín. Referenčné látky sa musia degradovať v primerane krátkom čase, v opačnom prípade sa odporúča, aby sa test zopakoval s použitím inej vzorky morskej vody.

7. V kruhovom teste EK, v ktorom sa vzorky morskej vody odobrali z rôznych miest a v rôznych obdobiach roka (3), trvala lag fáza (t_L) jeden až štyri dni a čas na dosiahnutie 50 % degradácie (t_{50}) okrem lag fázy bol jeden až sedem dní pre benzoan sodný. Pre anilín sa hodnota t_L pohybovala od nula do desať dní, kým hodnota t_{50} bola v rozsahu jeden až desať dní.

OPAKOVATEĽNOSŤ A CITLIVOSŤ METÓDY

8. Opakovateľnosť metódy sa stanovila v kruhovom teste (3). Najnižšiu koncentráciu testovanej látky, pre ktorú možno túto metódu použiť s analýzou DOC, vo veľkej miere určuje detekčný limit analýzy organického uhlíka (v súčasnosti približne 0,5 mg C/l) a koncentrácia rozpusteného organického uhlíka v použitej morskej vode (zvyčajne rádovo 3 – 5 mg/l pre vodu z otvoreného mora). Koncentrácia DOC v pozadí by nemala presiahnuť približne 20 % celkovej koncentrácie DOC po pridaní testovanej látky. Ak to nie je uskutočniteľné, koncentráciu DOC v pozadí

▼M6

možno niekedy znížiť tak, že morská voda sa pred testom nechá zrieť. Ak sa metóda používa len so špecifickou chemickou analýzou (ktorou sa meria primárna degradácia), výskumník musí uviesť dodatočné informácie o tom, či možno očakávať úplnú degradáciu. Tieto dodatočné informácie môžu zahŕňať výsledky iných testov ľahkej alebo inherentnej biodegradovateľnosti.

OPIS METÓDY

Prístroje

9. Bežné laboratórne zariadenie a:

a) trepačka prispôsobená na pollitrové až dvojlitrové Erlenmeyerove banky, buď s automatickou reguláciou teploty, alebo umiestnená v miestnosti so stabilnou teplotou 15 – 20 °C regulovanou v rozmedzí ± 2 °C;

b) pollitrové až dvojlitrové Erlenmeyerove banky s úzkym hrdlom;

c) zariadenie na membránovú filtráciu alebo odstredivka;

d) membránové filtre 0,2 – 0,45 μm;

e) analyzátor uhlíka;

f) zariadenie na špecifickú analýzu (voliteľné).

Morská voda

10. Odoberte vzorku morskej vody do dôkladne vyčistenej nádoby a dopravte ju do laboratória najlepšie do jedného alebo dvoch dní od odberu. Počas prepravy nedovoľte, aby teplota vzorky výrazne presiahla teplotu, aká sa použije v teste. Presne identifikujte miesto odberu vzorky a opíšte jeho stav z hľadiska znečistenia a živín. Najmä v prípade pobrežných vôd zahrňte do tejto charakterizácie počet heterotrofných mikrobiálnych kolónií a stanovenie koncentrácie rozpustených dusičnanov, amónnych iónov a fosforečnanov.

11. O samotnej vzorke morskej vody uveďte tieto informácie:

— dátum odberu,

— hĺbka odberu,

— vzhľad vzorky – zakalená atď.,

— teplota v čase odberu,

— slanosť,

— DOC,

— čas medzi odberom a použitím v teste.

12. Ak sa zistí vysoký obsah DOC vo vzorke morskej vody (bod 8), odporúča sa, aby sa morská voda nechala pred použitím zrieť približne jeden týždeň. Nechajte ju zrieť za aeróbnych podmienok pri testovacej teplote a v tme alebo pri difúznom osvetlení. Ak je to potrebné, udržiavajte aeróbne podmienky jemným prevzdušňovaním. Počas zretia sa zníži obsah ľahko

▼M6

degradovateľného
organického materiálu. V kruhovom teste (3) sa nezistili žiadne rozdiely medzi degradačným potenciálom vyzretých a čerstvo odobratých vzoriek morskej vody. Pred použitím predupravte morskú vodu tak, aby sa odstránili hrubé častice, napr. filtráciou cez nylonový filter alebo hrubý papierový filter (nie membránový ani GF-C filter) alebo sedimentáciou a dekantáciou. Použitý postup sa musí uviesť do správy. Ak nechávate vzorku zrieť, túto predúpravu vykonajte až potom.

Zásobné roztoky minerálnych živín

13. Pripravte tieto zásobné roztoky s použitím reaktantov analytickej čistoty:

a) Dihydrogénfosforečnan draselný, KH_2PO_4 8,50 g

Hydrogénfosforečnan didraselný, K_2HPO_4 21,75 g

Dihydrát hydrogénfosforečnanu disodného, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 33,30 g

Chlorid amónny, NH_4Cl 0,50 g

Rozpustite a doplňte destilovanou vodou do objemu 1 liter.

b) Chlorid vápenatý, $CaCl_2$ 27,50 g

Rozpustite a doplňte destilovanou vodou do objemu 1 liter.

c) Heptahydrát síranu horečnatého, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 22,50 g

Rozpustite a doplňte destilovanou vodou do objemu 1 liter.

d) Hexahydrát chloridu železitého, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,25 g

Rozpustite a doplňte destilovanou vodou do objemu 1 liter.

Zrazeninám v roztoku d) možno predísť pridaním jednej kvapky koncentrovanej HCl alebo 0,4 g kyseliny etyléndiamíntetraoctovej (EDTA, disodná soľ) na liter. Ak sa v zásobnom roztoku vytvorí zrazenina, nahraďte ho čerstvo pripraveným roztokom.

Príprava testovacieho média

14. Pridajte 1 ml každého z uvedených zásobných roztokov na liter predupravenej morskej vody.

Inokulum

15. Okrem mikroorganizmov, ktoré sú už prítomné v morskej vode, nepridávajte osobitné inokulum. Stanovte (voliteľne) počet heterotrofov tvoriacich kolónie v testovacom médiu morskej vody (a podľa možnosti aj v pôvodných vzorkách morskej vody), napr. spočítaním na miske s použitím morského agaru. To je potrebné najmä pre vzorky z pobrežných alebo znečistených oblastí. Skontrolujte heterotrofnú mikrobiálnu činnosť v morskej vode vykonaním testu s referenčnou látkou.

▼M6

Príprava baniek

16. Zabezpečte, aby bolo všetko sklo pred použitím dôkladne čisté, nie nevyhnutne sterilné (napr. s použitím alkoholovej kyseliny chlorovodíkovej), opláchnuté a vysušené, aby sa zabránilo kontaminácii zvyškami z predchádzajúcich testov. Banky sa takisto pred prvým použitím musia vyčistiť.

17. Testované látky v duplicitných bankách vyhodnocujte spolu s jednou bankou pre referenčnú látku. Vykonajte slepý test v duplikáte bez testovanej či referenčnej látky s cieľom stanoviť analytické slepé vzorky. Rozpustite testované látky v testovacom médiu – možno ich pohodlne pridať prostredníctvom koncentrovaného zásobného roztoku – aby sa dosiahla požadovaná počiatočná koncentrácia zvyčajne 5 – 40 mg DOC/l. Referenčnú látku otestujte vo zvyčajnej počiatočnej koncentrácii zodpovedajúcej 20 mg DOC/l. Ak sa používajú zásobné roztoky testovanej a/alebo referenčnej látky, zabezpečte, aby sa výrazne nezmenila slanosť média morskej vody.

18. Ak možno očakávať alebo nemožno vylúčiť toxické účinky, môže byť vhodné zahrnúť do koncepcie testu inhibičný pokus v duplikáte. Pridajte testovanú a referenčnú látku do rovnakej nádoby, pričom koncentrácia referenčnej látky je zvyčajne rovnaká ako v kontrolnom teste (t. j. 20 mg DOC/l), aby sa umožnilo porovnanie.

19. Pridajte primerané množstvá testovaných roztokov do Erlenmeyerových baniek (vhodné množstvo je najviac polovica objemu banky) a na každú banku nasaďte voľný kryt (napr. hliníkovú fóliu), ktorý umožňuje výmenu plynov medzi bankou a okolitým vzduchom. (Ak sa používa analýza DOC, vatové uzávery sú nevhodné.) Vložte nádoby do trepačky a počas celého testu nepretržite pretrepávajte pri miernej rýchlosti (napr. 100 ot./min.). Regulujte teplotu (15 – 20 °C v rozmedzí ± 2 °C) a chráňte nádoby pred svetlom, aby sa zabránilo rastu rias. Zabezpečte, aby vzduch neobsahoval toxické materiály.

Fyzikálno-chemický kontrolný test (voliteľný)

20. Ak existuje podozrenie na abiotickú degradáciu alebo mechanizmy straty, ako je hydrolýza (problém len v prípade špecifickej analýzy), prchanie alebo adsorpcia, odporúča sa vykonať fyzikálno-chemický kontrolný pokus. Možno ho vykonať pridaním chloridu ortutnatého ($HgCl_2$) ([1]) (50 – 100 mg/l) do nádob s testovanou látkou, aby sa zastavila mikrobiálna činnosť. Významný pokles hodnoty DOC alebo koncentrácie konkrétnej látky vo fyzikálno-chemickom kontrolnom teste nasvedčuje existencii mechanizmov abiotickej eliminácie. (Ak sa použije chlorid ortutnatý, pozornosť v analýze DOC by sa mala venovať interferenciám alebo otrave katalyzátorom).

Počet baniek

21. V typickom teste sa použijú tieto banky:

banky 1 a 2 – obsahujúce testovanú látku (testovaciu suspenziu),

banky 3 a 4 – obsahujúce len morskú vodu (slepé),

banka 5 – obsahujúca referenčnú látku (kontrola postupu),

banka 6 – obsahujúca testovanú a referenčnú látku (kontrola toxicity) – voliteľná,

banka 7 – obsahujúca testovanú látku a sterilizačné činidlo (abiotická sterilná kontrola) – voliteľná.

([1]) Chlorid ortutnatý ($HgCl_2$) je veľmi toxická látka, s ktorou by sa malo manipulovať za vhodných preventívnych opatrení. Vodné odpady obsahujúce túto chemikáliu by sa mali vhodným spôsobom zlikvidovať, nemali by sa teda vypúšťať do systému odpadových vôd.

▼M6

Analýza DOC

22. V priebehu testu odoberajte vo vhodných intervaloch vzorky na analýzu DOC (dodatok 1). Vždy odoberte vzorky na začiatku testu (0. deň) a v 60. deň. Na opis priebehu degradácie v čase je potrebných celkovo minimálne päť vzoriek. Nemožno uviesť žiadny pevný harmonogram odberu vzoriek, lebo miera biodegradácie sa líši. Na každej vzorke vykonajte stanovenie DOC v duplikáte.

Odber vzoriek

23. Požadovaný objem vzoriek závisí od analytickej metódy (špecifická analýza), použitého analyzátora uhlíka a postupu (membránová filtrácia alebo odstredenie) zvolených na úpravu vzorky pred stanovením uhlíka (body 25 a 26). Pred odberom vzoriek zabezpečte, aby bolo testovacie médium dobre premiešané a aby sa prípadný materiál prilepený na stene banky rozpustil alebo suspendoval.

24. Membránovú filtráciu alebo odstredenie vykonajte ihneď po odbere vzorky. Ak je to potrebné, filtrované alebo odstredené vzorky skladujte pri teplote 2 – 4 °C maximálne 48 hodín alebo pri teplote nižšej ako –18 °C v prípade dlhšieho skladovania (ak je známe, že to nebude mať vplyv na testovanú látku, pred uskladnením roztok okyslite na pH 2).

25. Membránové filtre (0,2 – 0,45 μm) sú vhodné, ak sa zabezpečí, aby neuvoľňovali uhlík ani neadsorbovali látku vo fáze filtrácie, napr. polykarbonátové membránové filtre. Niektoré membránové filtre sú impregnované povrchovo aktívnymi látkami na hydrofilizáciu a môžu uvoľňovať značné množstvo rozpusteného uhlíka. Tieto filtre pripravte prevarením v deionizovanej vode v troch po sebe nasledujúcich hodinových intervaloch. Po prevarení skladujte filtre v deionizovanej vode. Prvých 20 ml filtrátu zlikvidujte.

26. Ako alternatívu k membránovej filtrácii možno vykonať odstredenie vzoriek. Odstreďujte pri 40 000 $m.s^{-2}$ (~ 4 000 g) počas 15 minút, podľa možnosti v chladenej centrifúge.

Poznámka: Oddelenie celkového obsahu organického uhlíka (TOC) od DOC (TOC/DOC) odstreďovaním nefunguje pri veľmi nízkych koncentráciách, lebo buď sa neodstránia všetky baktérie, alebo sa uhlík ako súčasť bakteriálnej plazmy znovu rozpustí. Pri vyšších testovaných koncentráciách (> 10 mg C na liter) je chyba odstreďovania pomerne nižšia.

Frekvencia odberu vzoriek

27. Ak sa analýzy vykonávajú ihneď po odbere vzoriek, čas ďalšieho odberu vzoriek určite s ohľadom na výsledok analytického stanovenia.

28. Ak sa vzorky konzervujú (bod 24) na neskoršiu analýzu, odoberte viac vzoriek ako požadovaný minimálny počet päť. Najskôr analyzujte posledné vzorky, pričom postupným „spätným“ výberom vhodných vzoriek na analýzu možno s pomerne malým počtom analytických stanovení získať dobrý opis biodegradačnej krivky. Ak do konca testu nedošlo k žiadnej degradácii, nie je potrebné analyzovať žiadne ďalšie vzorky, a v takej situácii môže „spätná“ stratégia ušetriť značné náklady na analýzu.

▼M6

29. Ak sa plató degradačnej krivky pozoruje pred 60. dňom, test ukončite. Ak degradácia zjavne začala do 60. dňa, ale nedosiahla plató, predĺžte experiment o ďalšie obdobie.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

30. Zaznamenajte analytické výsledky na priloženú kartu údajov (dodatok 2) a vypočítajte hodnoty biodegradácie pre testovanú a referenčnú látku podľa rovnice:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

kde:

D_t = degradácia ako percentuálna eliminácia DOC alebo špecifickej látky v čase t,

C_o = počiatočná koncentrácia DOC alebo špecifickej látky v testovacom médiu,

C_t = koncentrácia DOC alebo špecifickej látky v testovacom médiu v čase t,

$C_{bl(0)}$ = počiatočná koncentrácia DOC alebo špecifickej látky v slepej vzorke,

$C_{bl(t)}$ = koncentrácia DOC alebo špecifickej látky v slepej vzorke v čase t.

31. Degradáciu uveďte ako percentuálnu elimináciu DOC (úplnú degradáciu) alebo elimináciu špecifickej látky (primárnu degradáciu) v čase t. Vypočítajte koncentrácie DOC s presnosťou na 0,1 mg na liter a priemery hodnôt D_t zaokrúhlite na najbližšie celé percento.

32. Priebeh degradácie graficky znázornite v diagrame uvedenom na obrázku v oddiele „Validita a interpretácia výsledkov“. Ak máte dostatok údajov, vypočítajte z krivky lag fázu (t_L) a čas potrebný na dosiahnutie 50 % eliminácie od konca lag fázy (t_{50}).

Protokol o skúške

33. Protokol o skúške musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje.

Podmienky testu:

— umiestnenie a opis miesta odberu vzoriek, stav znečistenia a živín (počet kolónií, dusičnany, amóniové ióny, fosforečnany, ak je to vhodné),

— charakteristiky vzorky [dátum odberu vzorky, hĺbka, vzhľad, teplota, slanosť, DOC (voliteľné), čas medzi odberom a použitím v teste],

▼M6

— použitá metóda zretia morskej vody (ak sa použije),

— metóda použitá na predúpravu (filtrácia/sedimentácia) morskej vody,

— metóda použitá na stanovenie DOC,

— metóda použitá na špecifickú analýzu (voliteľné),

— metóda použitá na určenie počtu heterotrofov v morskej vode (metóda počítania na miske alebo alternatívny postup) (voliteľné),

— iné metódy (voliteľné) použité na stanovenie vlastností morskej vody (merania ATP atď.).

Výsledky:

— analytické údaje uvedené na karte údajov (dodatok 2),

— priebeh testu degradácie sa graficky znázorňuje v diagrame zobrazujúcom lag fázu (t_L), sklon a čas (od konca lag fázy) na dosiahnutie 50 % eliminácie (t_{50}). Lag fázu možno graficky odhadnúť podľa obrázka v oddiele „Validita a interpretácia výsledkov“ alebo jednoducho uviesť ako čas potrebný na 10 % degradáciu,

— percentuálna degradácia odmeraná po 60 dňoch alebo na konci testu.

Rozbor výsledkov

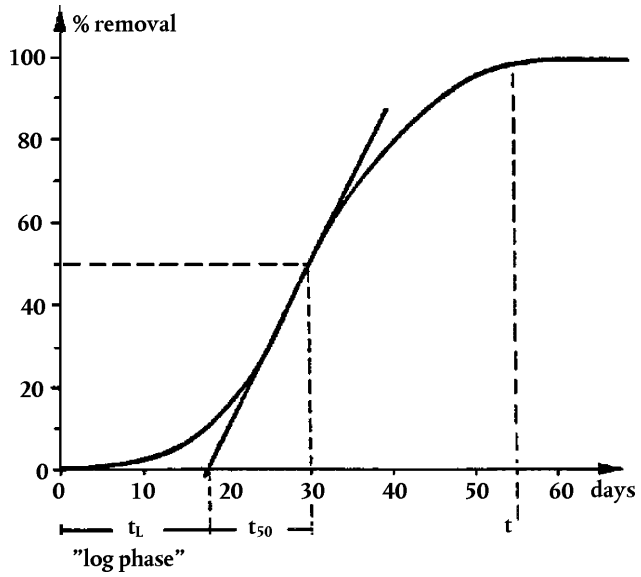
Validita a interpretácia výsledkov

34. Výsledky získané použitím referenčných látok, napr. benzoanu sodného, octanu sodného alebo anilínu, by mali byť porovnateľné s výsledkami získanými v kruhovom teste (3) (pozri oddiel „Referenčné látky“, bod 7). Ak sú výsledky získané s použitím referenčných látok atypické, test by sa mal zopakovať s použitím inej vzorky morskej vody. Hoci interpretácia výsledkov testov inhibície nemusí byť vždy jednoduchá vzhľadom na príspevok testovanej látky k DOC, výrazné zníženie celkovej miery eliminácie DOC v porovnaní s kontrolnou vzorkou je pozitívnou známkou toxických účinkov.

35. Vzhľadom na pomerne vysoké použité testované koncentrácie v porovnaní s väčšinou prírodných systémov (a teda nepriaznivý pomer medzi koncentráciami testovaných látok a iných zdrojov uhlíka) sa metóda má považovať za predbežnú skúšku, ktorú možno použiť na stanovenie, či látka je alebo nie je ľahko biodegradovateľná. V súlade s tým ani nízky výsledok nemusí nutne znamenať, že testovaná látka nie je biodegradovateľná v morskom prostredí, ale poukazuje na to, že na stanovenie tejto skutočnosti je potrebné vykonať ďalší výskum.

Na nasledujúcom obrázku je uvedený príklad teoretického pokusu s degradáciou, ktorý znázorňuje uskutočniteľný spôsob odhadu hodnôt t_L (dĺžka „lag fázy“) a t_{50} (časový interval začínajúci pri t_L potrebný na dosiahnutie 50 % eliminácie).

▼M6



METÓDA UZAVRETEJ FĽAŠE

ÚVOD

1. Táto metóda je variantom testu uzavretej fľaše (5) s morskou vodou. Vypracovala sa na základe kruhového testu, ktorý pre Európsku komisiu (EK) uskutočnil dánsky Ústav pre kvalitu vody (3).

2. Tak ako v prípade sprievodnej metódy trepačkovej banky pre morskú vodu, výsledky tohto testu sa nepovažujú za ukazovatele ľahkej biodegradovateľnosti, ale majú sa použiť najmä na získanie informácií o biodegradovateľnosti látok v morskom prostredí.

PRINCÍP METÓDY

3. Vopred stanovené množstvo testovanej látky sa rozpustí v testovacom médiu v koncentrácii zvyčajne 2 – 10 mg testovanej látky na liter (možno použiť jednu alebo viac koncentrácií). Tento roztok sa uchováva v naplnenej uzavretej fľaši v tme v kúpeli alebo v komore s konštantnou teplotou regulovanou na ± 1 °C v rozsahu 15 – 20 °C. V prípadoch, keď je cieľom štúdie simulovať situácie v životnom prostredí, sa testy môžu uskutočniť aj mimo tohto normálneho rozsahu teplôt za predpokladu, že sa vhodne upraví regulácia teploty. Po degradácii nasleduje analýza kyslíka počas 28-dňového obdobia.

4. V kruhovom teste sa ukázalo, že ak test trval dlhšie ako 28 dní, vo väčšine prípadov sa nezískali žiadne užitočné informácie v dôsledku závažných interferencií. Hodnoty biochemickej spotreby kyslíka (BSK) v slepých vzorkách boli príliš vysoké pravdepodobne v dôsledku rastu na stenách spôsobeného nedostatkom miešania a v dôsledku nitrifikácie. Odporúčaná dĺžka je preto 28 dní, ale ak hodnota BSK v slepých vzorkách zostane v rámci hranice 30 % (body 15 a 40), test sa môže predĺžiť.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

5. Na to, aby bolo možné určiť, či sa test môže použiť na konkrétnu látku, musia byť známe niektoré jej vlastnosti. Vyžaduje sa empirický vzorec na výpočet teoretickej spotreby kyslíka (ThOD) (pozri dodatok 3). Ak nie je k dispozícii, musí sa stanoviť chemická spotreba kyslíka (ChSK) látky, ktorá bude slúžiť ako referenčná hodnota. Použitie ChSK je menej uspokojivé, lebo niektoré látky sa v teste ChSK úplne neoxidujú.

▼M6

6. Rozpustnosť látky by mala byť aspoň 2 mg/l, hoci v zásade možno testovať aj menej rozpustné látky (napr. pomocou ultrazvuku), ako aj prchavé látky. Potrebné sú informácie o čistote alebo pomernom zastúpení hlavných zložiek testovanej látky, aby bolo možné interpretovať získané výsledky, a to najmä v prípade, že výsledok je blízko „úspešnej“ úrovne.

7. Informácie o toxicite látky pre baktérie, napríklad údaje namerané v krátkodobých testoch spotreby kyslíka (4), môžu byť veľmi užitočné pri výbere vhodných testovaných koncentrácií a môžu byť rozhodujúce na správnu interpretáciu nízkych hodnôt biodegradácie. Tieto informácie však nie sú vždy dostatočné na interpretáciu výsledkov získaných v teste na biologickú odbúrateľnosť a vhodnejší je postup opísaný v bode 27.

REFERENČNÉ LÁTKY

8. Na kontrolu mikrobiálnej činnosti vo vzorke morskej vody sa musia použiť vhodné referenčné látky. Na tieto účely možno použiť (napríklad) anilín, octan sodný či benzoan sodný. V rozumnom čase musí dôjsť k aspoň 60 % (z ich ThOD) degradácii týchto látok, inak sa odporúča, aby sa test zopakoval s použitím inej vzorky morskej vody.

9. V kruhovom teste EK, v ktorom sa vzorky morskej vody odobrali z rôznych miest a v rôznych obdobiach roka, trvala lag fáza (t_L) 0 – 2 dni a čas na dosiahnutie 50 % degradácie (t_{50}) okrem lag fázy bol 1 – 4 dni pre benzoan sodný. Pre anilín bola hodnota t_L 0 – 7 dní a hodnota t_{50} 2 – 12 dní.

REPRODUKOVATEĽNOSŤ

10. Opakovateľnosť metód sa stanovila v kruhovom teste EK (3).

OPIS METÓDY

Prístroje

11. Bežné laboratórne vybavenie a:

a) možno použiť 250 – 300 ml fľaše na meranie BSK so sklenenými uzávermi alebo 250 ml fľaše s úzkym hrdlom so sklenenými uzávermi;

b) viaceré dvojlitrové, trojlitrové a štvorlitrové fľaše s litrovými značkami na prípravu pokusu a na naplnenie fliaš na meranie BSK;

c) vodný kúpeľ alebo miestnosť s konštantnou teplotou na udržiavanie fliaš pri konštantnej teplote (± 1 °C) s vylúčením svetla;

d) zariadenie na analýzu rozpusteného kyslíka;

e) membránové filtre 0,2 – 0,45 μm (voliteľné);

f) zariadenie na špecifickú analýzu (voliteľné).

Morská voda

12. Odoberte vzorku morskej vody do dôkladne vyčistenej nádoby a prepravte ju do laboratória najlepšie do jedného alebo dvoch dní od odberu. Počas prepravy nedovoľte, aby teplota vzorky výrazne presiahla teplotu, aká sa použije v teste.

▼**M6**

13. Presne identifikujte miesto odberu vzorky a opíšte jeho stav z hľadiska znečistenia a živín. Najmä v prípade pobrežných alebo znečistených vôd zahrňte do tejto charakterizácie počet heterotrofných mikrobiálnych kolónií a stanovenie koncentrácie rozpustených dusičnanov, amónnych iónov a fosforečnanov.

14. O samotnej vzorke morskej vody uveďte tieto informácie:

— dátum odberu,

— hĺbka odberu,

— vzhľad vzorky – zakalená atď.,

— teplota v čase odberu,

— slanosť,

— rozpustený organický uhlík (DOC),

— čas medzi odberom a použitím v teste.

15. Ak sa zistí vysoký obsah DOC vo vzorke alebo ak sa usúdi, že hodnota BSK v slepej vzorke by po 28 dňoch bola vyššia ako 30 % hodnoty referenčných látok, odporúča sa, aby sa morská voda nechala pred použitím zrieť približne jeden týždeň.

16. Nechajte vzorku zrieť za aeróbnych podmienok pri testovacej teplote a v tme alebo pri difúznom osvetlení. Ak je to potrebné, udržiavajte aeróbne podmienky jemným prevzdušňovaním. Počas zretia sa zníži obsah ľahko degradovateľného organického materiálu. V kruhovom teste (3) sa nezistili žiadne rozdiely medzi degradačným potenciálom vyzretých a čerstvo odobratých vzoriek morskej vody.

17. Pred použitím predupravte morskú vodu tak, aby sa odstránili hrubé častice, napr. filtráciou cez nylonový filter alebo hrubý papierový filter (nie membránový ani GF-C filter) alebo sedimentáciou a dekantáciou. Použitý postup uveďte do správy. Ak nechávate vzorku zrieť, túto predúpravu vykonajte až potom.

Zásobné roztoky minerálnych živín

18. Pripravte tieto zásobné roztoky s použitím reaktantov analytickej čistoty:

a) Dihydrogénfosforečnan draselný, KH_2PO_4 8,50 g

Hydrogénfosforečnan didraselný, K_2HPO_4 21,75 g

Dihydrát hydrogénfosforečnanu disodného, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 33,30 g

Chlorid amónny, NH_4Cl 0,50 g

Rozpustite a doplňte destilovanou vodou do objemu 1 liter.

b) Chlorid vápenatý, $CaCl_2$ 27,50 g

Rozpustite a doplňte destilovanou vodou do objemu 1 liter.

c) Heptahydrát síranu horečnatého, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 22,50 g

Rozpustite a doplňte destilovanou vodou do objemu 1 liter.

d) Hexahydrát chloridu železitého, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,25 g

Rozpustite a doplňte destilovanou vodou do objemu 1 liter.

▼M6

Zrazeninám v roztoku d) možno predísť pridaním jednej kvapky koncentrovanej HCl alebo 0,4 g kyseliny etyléndiamíntetraoctovej (EDTA, disodná soľ) na liter. Ak sa v zásobnom roztoku vytvorí zrazenina, nahraďte ho čerstvo pripraveným roztokom.

Príprava testovacieho média

19. Pridajte 1 ml každého z uvedených zásobných roztokov na liter predupravenej morskej vody. Nasýťte testovacie médium vzduchom pri testovacej teplote metódou prevzdušňovania čistým stlačeným vzduchom počas približne 20 minút. Stanovte koncentráciu rozpusteného kyslíka na účely kontroly. Nasýtenú koncentráciu rozpusteného kyslíka ako funkciu slanosti a teploty možno odčítať z nomogramu priloženého k tejto testovacej metóde (dodatok 4).

Inokulum

20. Okrem mikroorganizmov, ktoré sú už prítomné v morskej vode, nepridávajte osobitné inokulum. Stanovte (voliteľne) počet heterotrofov tvoriacich kolónie v testovacom médiu morskej vody (a podľa možnosti aj v pôvodnej vzorke morskej vody), napr. spočítaním na miske s použitím morského agaru. To je potrebné najmä pre vzorky z pobrežných alebo znečistených oblastí. Skontrolujte heterotrofnú mikrobiálnu činnosť v morskej vode vykonaním testu s referenčnou látkou.

Príprava testovacích fliaš

21. Vykonajte všetky potrebné úpravy vrátane zretia a predúpravy morskej vody pri zvolenej testovacej teplote 15 – 20 °C, pričom zabezpečte čistotu, ale nie sterilnosť, všetkého skla.

22. Pripravte skupiny fliaš na stanovenie BSK testovanej a referenčnej látky v sérii súbežných pokusov. Všetky analýzy vykonajte v duplicitných fľašiach (slepé vzorky, referenčná a testovaná látka), t. j. pripravte dve fľaše pre každé stanovenie. Analýzy vykonajte minimálne v 0., 5., 15. a 28. deň (štyri stanovenia). Na účely analýz kyslíka si štyri stanovenia vyžadujú celkovo $3 \times 2 \times 4 = 24$ fliaš (slepá vzorka, referenčná a testovaná látka), a teda približne 8 litrov testovacieho média (na jednu koncentráciu testovanej látky).

23. Pripravte samostatné roztoky testovanej a referenčnej látky vo veľkých fľašiach s dostatočným objemom (bod 11) tak, že najskôr pridáte testovanú a referenčnú látku do čiastočne naplnených veľkých fliaš buď priamo, alebo prostredníctvom koncentrovaného zásobného roztoku. Pridajte ďalšie testovacie médium, aby sa dosiahli požadované konečné koncentrácie. Ak sa používajú zásobné roztoky testovanej a/alebo referenčnej látky, zabezpečte, aby sa výrazne nezmenila slanosť média morskej vody.

24. Koncentrácie testovanej a referenčnej látky zvoľte s ohľadom na:

a) rozpustnosť rozpusteného kyslíka v morskej vode pri použitej testovacej teplote a slanosti (pozri priložený nomogram – dodatok 4);

b) hodnotu BSK morskej vody v slepej vzorke a

c) očakávanú biodegradovateľnosť testovanej látky.

▼M6

25. Pri teplotách 15 °C a 20 °C a slanosti 32 promile (oceánska voda) je rozpustnosť rozpusteného kyslíka približne 8,1, resp. 7,4 mg/l. Ak sa morská voda nenechá zrieť, spotreba kyslíka samotnej morskej vody (spotreba kyslíka v slepej vzorke) môže byť 2 mg O_2/l alebo vyššia. Preto s cieľom zabezpečiť značnú koncentráciu kyslíka, ktorý zostane po oxidácii testovanej látky, použite počiatočnú koncentráciu testovanej látky približne 2 – 3 mg/l (v závislosti od hodnoty ThOD) pre látky, pri ktorých sa očakáva, že sa úplne degradujú za podmienok testu (napr. referenčné látky). Menej degradovateľné látky testujte pri vyšších koncentráciách až do približne 10 mg/l za predpokladu, že sa neprejavia toxické účinky. Môže byť výhodné vykonať súbežné testy s nízkou (približne 2 mg/l) a vysokou (približne 10 mg/l) koncentráciou testovanej látky.

26. Súbežne sa musí stanoviť kyslíková slepá vzorka vo fľašiach bez testovanej alebo referenčnej látky.

27. Ak sa majú stanoviť inhibičné účinky, pripravte túto sériu roztokov v samostatných veľkých fľašiach (bod 13):

a) 2 mg na liter ľahko degradovateľnej látky, napr. ktorejkoľvek z uvedených referenčných látok;

b) x mg na liter testovanej látky (x je zvyčajne 2);

c) 2 mg na liter ľahko degradovateľnej látky plus x mg na liter testovanej látky.

Fyzikálno-chemický kontrolný test (voliteľný)

28. Ak sa využije možnosť špecifických analýz, možno vykonať fyzikálno-chemický pokus na kontrolu, či sa testovaná látka eliminuje abiotickými mechanizmami, napr. hydrolýzou alebo adsorpciou. Fyzikálno-chemický kontrolný test možno vykonať pridaním chloridu ortutnatého ($HgCl_2$) ([1]) (50 – 100 mg/l) do duplicitných baniek s testovanou látkou, aby sa zastavila mikrobiálna činnosť. Významný pokles koncentrácie konkrétnej látky v priebehu testu nasvedčuje existencii mechanizmov abiotickej eliminácie.

Počet fliaš na meranie BSK v typickom teste

29. V typickom teste sa použijú tieto fľaše:

— aspoň osem fliaš obsahujúcich testovanú látku,

— aspoň osem fliaš obsahujúcich len morskú vodu obohatenú živinami,

— aspoň osem fliaš obsahujúcich referenčnú látku a podľa potreby

— šesť fliaš obsahujúcich testovanú a referenčnú látku (kontrola toxicity).

POSTUP

30. Po príprave ihneď odčerpajte každý roztok zo spodnej štvrtiny (nie z dna) príslušnej veľkej fľaše a naplňte príslušnú skupinu fliaš na meranie BSK. Ihneď analyzujte nulové kontrolné vzorky (v čase nula) z hľadiska rozpusteného kyslíka (bod 33) alebo ich uchovajte na neskoršiu chemickú analýzu vyzrážaním s $MnCl_2$ (chlorid mangánatý) a NaOH (hydroxid sodný).

([1]) Chlorid ortutnatý ($HgCl_2$) je veľmi toxická látka, s ktorou by sa malo manipulovať za vhodných preventívnych opatrení. Vodné odpady obsahujúce túto chemikáliu by sa mali vhodným spôsobom zlikvidovať, nemali by sa teda vypúšťať priamo do systému odpadových vôd.

▼M6

31. Inkubujte zvyšné paralelné fľaše na meranie BSK pri testovacej teplote (15 – 20 °C) v tme. Vo vhodných časových intervaloch (napr. po 5., 15. a 28. dni ako minimum) vyberte fľaše z inkubácie a analyzujte rozpustený kyslík (bod 33).

32. Špecifické analýzy vzoriek (voliteľné) vykonajte s použitím membránového filtra (0,2 – 0,45 μm) alebo odstredenia počas 15 minút. Ak sa vzorky neanalyzujú ihneď, skladujte maximálne 48 hodín pri teplote 2 – 4 °C alebo dlhšie pri teplote –18 °C (ak je známe, že to nebude mať vplyv na testovanú látku, pred uskladnením roztok okyslite na pH 2).

Stanovenie rozpusteného kyslíka

33. Stanovte koncentráciu rozpusteného kyslíka chemickou alebo elektrochemickou metódou, ktorá je uznaná na vnútroštátnej alebo medzinárodnej úrovni.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

34. Analytické výsledky zaznamenajte do priložených kariet údajov (dodatok 5).

35. Vypočítajte BSK ako rozdiel v spotrebe kyslíka medzi slepou vzorkou a roztokom testovanej látky za podmienok testu. Vydeľte čistú spotrebu kyslíka koncentráciou (hmotnosť/objem) látky s cieľom vyjadriť hodnotu BSK ako mg BSK/mg testovanej látky. Degradácia je vymedzená ako pomer biochemickej spotreby kyslíka buď k teoretickej spotrebe kyslíka (ThOD), ak je to možné, alebo k chemickej spotrebe kyslíka (ChSK) a je vyjadrená ako percento (pozri bod 36).

36. Vypočítajte hodnoty biodegradácie v každom čase odberu vzoriek pre testovanú i referenčnú látku pomocou jednej z týchto rovníc:

$$\%\ biodegradácie = \frac{mg\ O_2/mg\ testovanej\ látky}{mg\ ThOD/mg\ testovanej\ látky} \times 100$$

$$\%\ biodegradácie = \frac{mg\ O_2/mg\ testovanej\ látky}{mg\ COD/mg\ testovanej\ látky} \times 100$$

kde:

ThOD = teoretická spotreba kyslíka (výpočet v dodatku 3),

ChSK = chemická spotreba kyslíka, stanovená experimentálne.

Poznámka: Niekedy sa týmito dvoma spôsobmi výpočtu (percento ThOD alebo percento ChSK) nezískajú rovnaké výsledky. Odporúča sa použiť metódu ThOD, lebo niektoré látky sa v teste ChSK úplne neoxidujú.

37. Priebeh testu degradácie graficky znázornite v diagrame (pozri príklad v oddiele „Validita a interpretácia výsledkov“). Ak máte dostatok údajov, vypočítajte z biodegradačnej krivky lag fázu (t_L) a čas potrebný na dosiahnutie 50 % eliminácie od konca lag fázy (t_{50}).

38. Ak sa použije špecifická analýza (voliteľná), uveďte percento primárnej degradácie ako percento eliminácie špecifickej látky v rámci testovacieho obdobia (s korekciou vzhľadom analytické slepé vzorky).

▼M6

Protokol o skúške

39. Protokol o skúške musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje.

Podmienky testu:

— umiestnenie a opis miesta odberu vzoriek: stav znečistenia a živín (počet kolónií, dusičnany, amóniové ióny, fosforečnany, ak je to vhodné),

— charakteristiky vzorky [dátum odberu vzorky, hĺbka, vzhľad, teplota, slanosť, DOC (voliteľné), čas medzi odberom a použitím v teste],

— použitá metóda zretia morskej vody (ak sa použije),

— metóda použitá na predúpravu (filtrácia/sedimentácia) morskej vody,

— metóda použitá na stanovenie ChSK (ak sa vykonáva),

— metóda použitá na merania kyslíka,

— postup disperzie pre látky, ktoré sú slabo rozpustné za testovacích podmienok,

— metóda použitá na určenie počtu heterotrofov v morskej vode (metóda počítania na miske alebo alternatívny postup),

— metóda použitá na stanovenie DOC v morskej vode (voliteľné),

— metóda použitá na špecifickú analýzu (voliteľné),

— iné voliteľné metódy použité na stanovenie vlastností morskej vody (merania ATP atď.).

Výsledky:

— analytické údaje uvedené na karte údajov (priloženej v dodatku 5),

— priebeh testu degradácie graficky znázornený v diagrame zobrazujúcom lag fázu (t_L), sklon a čas (od konca lag fázy) na dosiahnutie 50 % konečnej spotreby kyslíka spôsobenej oxidáciou testovanej látky (t_{50}); lag fázu možno graficky odhadnúť podľa pripojeného obrázka alebo jednoducho uviesť ako čas potrebný na 10 % degradáciu,

— percentuálna degradácia odmeraná po 28 dňoch.

Rozbor výsledkov

Validita a interpretácia výsledkov

40. Spotreba kyslíka v slepej vzorke by nemala presiahnuť 30 % kyslíka v testovacej fľaši. Ak nie je možné splniť toto kritérium s použitím čerstvo odobratej morskej vody, morská voda sa pred použitím musí nechať vyzrieť (stabilizovať).

41. Treba zohľadniť možnosť, že výsledky môžu ovplyvniť látky obsahujúce dusík.

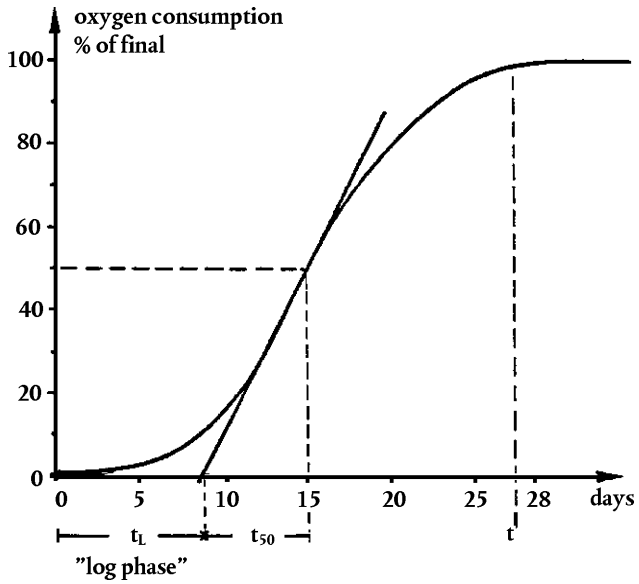
▼M6

42. Výsledky získané použitím referenčných látok benzoanu sodného a anilínu by mali byť porovnateľné s výsledkami získanými v kruhovom teste (3) (bod 9). Ak sú výsledky získané s použitím referenčných látok atypické, test by sa mal zopakovať s použitím inej vzorky morskej vody.

43. Testovaná látka sa môže považovať za inhibujúcu pre baktérie (pri použitej koncentrácii), ak je hodnota BSK zmesi a referenčnej a testovanej látky nižšia než súčet hodnôt BSK pre samostatné roztoky týchto dvoch látok.

44. Vzhľadom na pomerne vysoké použité testované koncentrácie v porovnaní s väčšinou prírodných systémov (a teda nepriaznivý pomer medzi koncentráciami testovaných látok a iných zdrojov uhlíka) sa metóda má považovať za predbežnú skúšku, ktorú možno použiť na stanovenie, či látka je alebo nie je ľahko biodegradovateľná. V súlade s tým ani nízky výsledok nemusí nutne znamenať, že testovaná látka nie je biodegradovateľná v morskom prostredí, ale poukazuje na to, že na stanovenie tejto skutočnosti je potrebné vykonať ďalší výskum.

Na nasledujúcom obrázku je uvedený príklad teoretického pokusu s degradáciou, ktorý znázorňuje uskutočniteľný spôsob odhadu hodnôt t_L (dĺžka „lag fázy“) a t_{50}, teda časového intervalu (začínajúceho pri t_L) potrebného na dosiahnutie 50 % konečnej spotreby kyslíka spôsobenej oxidáciou testovanej látky:



LITERATÚRA

1. de Kreuk J.F. a Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. Chemosphere, 10 (6); 561 – 573.

2. Kapitola C.4 B tejto prílohy: Stanovenie „ľahkej“ biodegradovateľnosti, časť III modifikovaný skríningový test OECD.

3. Nyholm N. a Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, marec 1987, Komisia Európskych spoločenstiev.

4. Kapitola C.11 tejto prílohy: Biodegradácia – respiračno-inhibičný test aktivovaného kalu.

5. Kapitola C.4 E tejto prílohy: Stanovenie ľahkej biodegradovateľnosti, časť VI test v uzavretej fľaši.

▼M6

Dodatok 1

Stanovenie organického uhlíka v morskej vode

METÓDA TREPAČKOVEJ BANKY

Na stanovenie obsahu organického uhlíka vo vzorke vody sa organické zlúčeniny vo vzorke oxidujú na oxid uhličitý zvyčajne pomocou jednej z týchto troch metód:

— oxidáciou za mokra pomocou persíranu/UV ožarovania,

— oxidáciou za mokra pomocou persíranu/zvýšenej teploty (116 – 130 °C),

— spaľovaním.

Uvoľnený CO_2 sa kvantifikuje pomocou infračervenej spektrometrie alebo titrimetrie. Alternatívne sa CO_2 redukuje na metán, ktorý sa kvantifikuje na plameňovo-ionizačnom detektore (FID).

Metóda využívajúca persíran/UV ožarovanie sa bežne používa na analýzu „čistej“ vody s nízkym obsahom tuhých častíc. Posledné dve metódy možno uplatniť na väčšinu druhov vzoriek vody, pričom metóda oxidácie pomocou persíranu/zvýšenej teploty je najvhodnejšia pre vzorky s nízkou koncentráciou a metódu spaľovania možno použiť na vzorky s obsahom neprchavého organického uhlíka (NVOC) výrazne vyšším ako 1 mg C/l.

Interferencie

Všetky tri metódy sú závislé od eliminácie alebo kompenzácie anorganického uhlíka (IC) prítomného vo vzorke. Odstránenie CO_2 z okyslenej vzorky je najčastejšie používanou metódou eliminácie IC, hoci to vedie aj k strate prchavých organických zlúčenín (1). V každej matrici vzorky sa musí zabezpečiť úplná eliminácia alebo kompenzácia IC a okrem hodnoty NVOC sa musí stanoviť aj obsah prchavého organického uhlíka (VOC) v závislosti od druhu vzorky.

Vysoké koncentrácie chloridu vedú k zníženiu oxidačnej účinnosti pomocou metódy persíranu/UV ožarovania (2). Túto interferenciu však možno odstrániť použitím oxidačného činidla upraveného pridaním dusičnanu ortutnatého. Odporúča sa, aby sa na vyhodnotenie každého druhu vzorky obsahujúcej chlorid použil maximálny prípustný objem vzorky. Vysoké koncentrácie solí vo vzorke analyzovanej metódou spaľovania môžu spôsobiť soľný povlak na katalyzátore a nadmernú koróziu spaľovacej trubice. Mali by sa prijať preventívne opatrenia podľa príručky výrobcu.

Veľmi zakalené vzorky, ako aj vzorky obsahujúce tuhé častice, sa pri použití metódy persíranu/UV ožarovania nemusia úplne oxidovať.

Príklad vhodnej metódy

Neprchavý organický uhlík sa stanoví metódou persíranu/UV ožarovania a následnou kvantifikáciou uvoľneného CO_2 pomocou nedisperznej infračervenej spektrometrie.

Oxidačné činidlo sa upraví v súlade s odporúčaniami uvedenými v literatúre (2) podľa príručky výrobcu:

a) 8,2 g $HgCl_2$ a 9,6 g $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ sa rozpustí v niekoľkých stovkách mililitrov reagenčnej vody s nízkou koncentráciou uhlíka;

b) 20 g $K_2S_2O_8$ sa rozpustí v soľnom roztoku ortuti;

▼**M6**

c) do zmesi sa pridá 5 ml HNO_3 (konc.);

d) reaktant sa zriedi na 1 000 ml.

Interferencia chloridu sa odstráni pomocou objemu vzorky 40 µl pre 10 % chloridu a objemu vzorky 200 µl pre 1,9 % chloridu. Vzorky s vysokou koncentráciou chloridu a/alebo väčším objemom možno touto metódou analyzovať za predpokladu, že sa zabráni hromadeniu chloridu v oxidačnej nádobe. Následne sa podľa možnosti môže pre daný druh vzorky vykonať stanovenie prchavého organického uhlíka.

LITERATÚRA

1. ISO, Water quality – determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, 16. január 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.

Tiež relevantné (poskytuje opis systému autoanalýzy):

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

Dodatok 2

Biodegradácia v morskej vode

METÓDA TREPAČKOVEJ BANKY

KARTA ÚDAJOV

1. **LABORATÓRIUM:**

2. **DÁTUM ZAČIATKU TESTU:**

3. **TESTOVANÁ LÁTKA:**

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku:		mg/l ako látka
Počiatočná koncentrácia v médiu, t_o:		mg/l ako látka
	:	mg DOC/l

4. **MORSKÁ VODA:**

Zdroj:

Dátum odberu:

Hĺbka odberu:

Vzhľad v čase odberu (napr. zakalená atď.):

Slanosť pri odbere:	‰
Teplota pri odbere:	°C
DOC „x“ hodín po odbere:	mg/l

Predúprava pred testovaním (napr. filtrácia, sedimentácia, zretie atď.):

Počet mikrobiálnych kolónií	—	pôvodná vzorka:	kolónií/ml
	—	na začiatku testu:	kolónií/ml

Ďalšie vlastnosti:

5. **STANOVENIE UHLÍKA:**

Analyzátor uhlíka:

	Banka č.		DOC po n dňoch (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Test: morská voda obohatená živinami s testovanou látkou	1	a_1					
		a_2					
		priemer, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		priemer, $C_{b(t)}$					

▼**M6**

	Banka č.		DOC po n dňoch (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Slepá vzorka: morská voda obohatená živinami bez testovanej látky	1	c_1					
		c_2					
		priemer, $C_{c(t)}$					
	2	d_1					
		d_2					
		priemer, $C_{d(t)}$					
	priemer, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VYHODNOTENIE ZÁKLADNÝCH ÚDAJOV:**

Banka č.	Výpočet výsledkov	Degradácia v % po n dňoch				
		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				
Priemer (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) Hodnoty D_1 a D_2 by sa nemali spriemerovať, ak je medzi nimi výrazný rozdiel.

Poznámka: Podobné formáty možno použiť aj vtedy, keď po degradácii nasleduje špecifická analýza, a na kontrolu referenčnej látky a toxicity.

7. **ABIOTICKÁ DEGRADÁCIA (voliteľné)**

	Čas (dni)	
	0	t
DOC konc. (mg/l) v sterilnej kontrole	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotickej degradácie} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

▼M6

Dodatok 3

Výpočet teoretickej biochemickej spotreby kyslíka

METÓDA UZAVRETEJ FĽAŠE

Hodnota ThOD látky $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ s molekulovou hmotnosťou MW sa vypočíta podľa tohto vzorca:

$$ThOD_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

Tento výpočet znamená, že C sa mineralizuje na CO_2, H na H_2O, P na P_2O_5 a Na na Na_2O. Halogén sa eliminuje ako halogénvodík a dusík ako amoniak.

Príklad:

Glukóza $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$ThOD = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07\ mg\ O_2/mg\ glukózy$$

Molekulové hmotnosti iných solí ako solí alkalických kovov sa vypočítajú na základe predpokladu, že soli boli hydrolyzované.

Predpokladá sa, že síra sa oxiduje do stavu + 6.

Príklad:

n-dodecylbenzénsulfonát sodný $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34\ mg\ O_2/mg\ látky$$

V prípade látok s obsahom dusíka sa dusík môže eliminovať ako amoniak, dusitan alebo nitrát podľa rôznych teoretických biochemických spotrieb kyslíka.

$$ThOD_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2_p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

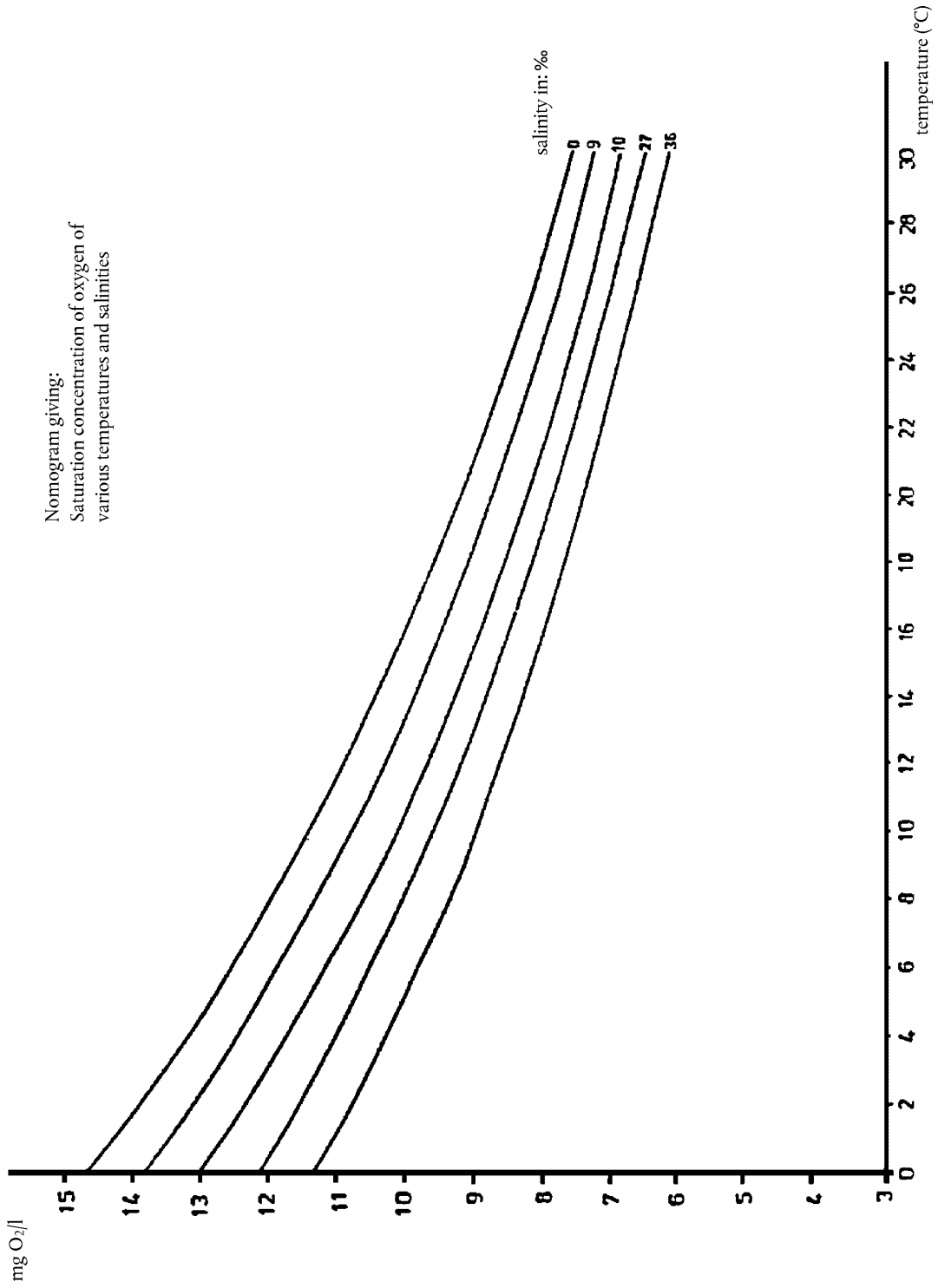
Predpokladajme, že v prípade sekundárneho amínu sa v analýze zistila úplná tvorba nitrátov:

$(C_{12}H_{25})_2$ NH, MW = 353

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44\ mg\ O_2/mg\ látky$$

▼**M6**

Dodatok 4


Nomogram giving:
Saturation concentration of oxygen of various temperatures and salinities
salinity in: ‰
0
9
10
27
36
temperature (°C)
mg O2/l

▼M6

Dodatok 5

Biodegradácia v morskej vode

METÓDA UZAVRETEJ FĽAŠE

KARTA ÚDAJOV

1. **LABORATÓRIUM:**

2. **DÁTUM ZAČIATKU TESTU:**

3. **TESTOVANÁ LÁTKA:**

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku:	mg/l
Počiatočná konc. v médiu morskej vody:	mg/l
ThOD alebo ChSK:	mg O_2/mg testovanej látky

4. **MORSKÁ VODA:**

Zdroj:

Dátum odberu:

Hĺbka odberu:

Vzhľad v čase odberu (napr. zakalená atď.):

Slanosť pri odbere:	‰
Teplota pri odbere:	°C
DOC „x“ hodín po odbere:	mg/l

Predúprava pred testovaním (napr. filtrácia, sedimentácia, zretie atď.):

Počet mikrobiálnych kolónií	— pôvodná vzorka:	kolónií/ml
	— na začiatku testu:	kolónií/ml

Ďalšie vlastnosti:

5. **TESTOVACIE MÉDIUM:**

Teplota po prevzdušnení:	°C
Koncentrácia O_2 po prevzdušnení a pred začiatkom testu:	mg O_2/l

6. **STANOVENIE ROZPUSTENÉHO KYSLÍKA:**

Metóda: Winklerova/elektródová

	Banka č.		mg O_2/l po n dňoch			
			0	5	15	28
Test: morská voda obohatená živinami s testovanou látkou	1	a_1				
	2	a_2				
	Priemer pre test	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼**M6**

	Banka č.		mg O_2/l po n dňoch			
			0	5	15	28
Slepá vzorka: živina – obohatená morská voda, ale bez testovanej látky	1	c_1				
	2	c_2				
	Priemer pre slepú vzorku	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Poznámka: Podobný formát možno použiť na kontrolu referenčnej látky a toxicity.

7. **SPOTREBA ROZPUSTENÉHO KYSLÍKA: % DEGRADÁCIE (% D):**

	Spotreba rozp. kyslíka po n dňoch		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ (1)			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)(1)}{testovaná\ látka(mg/l) \times ThOD} \times 100$			

(1) Tu sa predpokladá, že $m_{b(o)} = m_{t(o)}$, kde
$m_{b(o)}$ = hodnota pre slepú vzorku v 0. deň,
$m_{t(o)}$ = hodnota pre testovanú látku v 0. deň.
Ak sa $m_{b(o)}$ nerovná $m_{t(o)}$, použite $(m_{t(o)} - m_{t(x)}) - (m_{b(o)} - m_{b(x)})$, kde
$m_{b(x)}$ = hodnota pre slepú vzorku v deň x,
$m_{t(x)}$ = hodnota pre testovanú látku v deň x.

▼M6

C.43. **ANAERÓBNA BIODEGRADOVATEĽNOSŤ ORGANICKÝCH LÁTOK VO VYHNITOM KALE: MERANÍM TVORBY PLYNU**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 311 (2006). Existuje množstvo skríningových testov na hodnotenie aeróbnej biodegradovateľnosti organických látok [testovacie metódy C.4, C.9, C.10 a C.11 (1) a usmernenie OECD TG 302C (2)] a výsledky ich uplatňovania sa úspešne používajú na predpovedanie osudu látok v aeróbnom prostredí, najmä v aeróbnych fázach čistenia odpadových vôd. Aeróbne sa spracúvajú aj rôzne podiely látok nerozpustných vo vode a látok, ktoré sa adsorbujú na splaškové tuhé látky, lebo sú prítomné v usadených splaškových vodách. Väčšie frakcie týchto látok sú viazané na primárny usadený kal, ktorý sa oddeľuje od nespracovanej splaškovej vody v usadzovacích nádržiach pred tým, ako sa usadené alebo supernatantné splaškové vody čistia aeróbne. Kal, ktorý obsahuje niektoré z rozpustných látok v intersticiálnej tekutine, potom prechádza do zahrievaných vyhnívacích nádrží, kde dochádza k anaeróbnemu čisteniu. Doteraz v tejto sérii neexistovali testy na vyhodnotenie anaeróbnej biodegradovateľnosti v anaeróbnych vyhnívacích nádržiach a tento test má túto medzeru vyplniť, nemusí však byť nevyhnutne použiteľný v iných zložkách životného prostredia bez kyslíka.

2. Na vyhodnotenie anaeróbnej biodegradovateľnosti sa používajú respirometrické metódy merania množstva vytvoreného plynu, najmä metánu (CH_4) a oxidu uhličitého (CO_2) za anaeróbnych podmienok. Birch a kol. (3) preskúmali tieto postupy a dospeli k záveru, že najkomplexnejšia bola práca Sheltona a Tiedjeho (4) vychádzajúca z predchádzajúcich štúdií (5) (6) (7). Táto metóda (4), ktorú ďalej rozvinuli ďalší autori (8) a stala sa základom pre americké normy (9) (10), nevyriešila problémy týkajúce sa rozdielnych rozpustností CO_2 a CH_4 v testovacom médiu a výpočtu teoretickej tvorby plynu z testovanej látky. V správe ECETOC (3) sa odporúča ďalšie meranie obsahu rozpusteného anorganického uhlíka (DIC) v kvapalnom supernatante, čím sa táto metóda stala širšie použiteľnou. Metóda ECETOC prešla medzinárodnou kalibráciou (alebo kruhovým testom) a stala sa normou ISO 11734 (11).

3. Táto testovacia metóda, ktorá je založená na norme ISO 11734 (11), opisuje skríningovú metódu na hodnotenie potenciálnej anaeróbnej biodegradovateľnosti organických látok za osobitných podmienok (t. j. v anaeróbnych vyhnívacích nádržiach v danom čase a rozsahu koncentrácie mikroorganizmov). Keďže zriedený kal sa používa v pomerne vysokej koncentrácii testovanej látky a trvanie testu je zvyčajne dlhšie ako retenčný čas v anaeróbnych vyhnívacích nádržiach, podmienky testu nemusia nevyhnutne zodpovedať podmienkam v anaeróbnych vyhnívacích nádržiach ani nie sú použiteľné na hodnotenie anaeróbnej degradácie organických látok v iných podmienkach životného prostredia. Kal sa vystaví testovanej látke najviac na 60 dní, čo je dlhšie ako bežný retenčný čas kalu (25 – 30 dní) v anaeróbnych vyhnívacích nádržiach, hoci v priemyselných čistiarňach môžu byť retenčné časy oveľa dlhšie. Predpovede podľa výsledkov tohto testu nie sú také presvedčivé ako v prípade aeróbnej biodegradácie. Získané dôkazy o správaní testovaných látok v „ľahkých“ aeróbnych testoch a simulačných testoch a v aeróbnom prostredí sú totiž dostatočné na to, aby bolo možné presvedčivo tvrdiť, že medzi týmto správaním existuje spojenie. Len málo podobných dôkazov existuje v prípade anaeróbneho prostredia. Úplnú anaeróbnu degradáciu

▼M6

možno predpokladať vtedy, keď sa dosiahne 75 – 80 % teoretickej tvorby plynu. Vysoké podiely látky k biomase použité v týchto testoch znamenajú, že látka, ktorá prejde testom, sa s väčšou pravdepodobnosťou degraduje v anaeróbnej vyhnívacej nádrži. Ďalej platí, že látky, ktoré sa v teste nepremenia na plyn, sa nemusia nevyhnutne zachovať v realistickejšom životnom prostredí, pokiaľ ide o pomer látky a biomasy. Prebiehajú aj ďalšie anaeróbne reakcie, ktorými sa látky môžu aspoň čiastočne degradovať, napr. dechlorácia, ale v tomto teste sa tieto reakcie neodhalia. Uplatnením špecifických analytických metód na stanovenie testovanej látky však možno monitorovať jej elimináciu (pozri body 6, 30, 44 a 53).

PRINCÍP TESTU

4. Premytý spracovaný kal ([1]) s nízkou (< 10 mg/l) koncentráciou anorganického uhlíka (IC) sa zriedi približne desaťnásobne tak, aby sa dosiahla celková koncentrácia tuhých látok 1 – 3 g/l, a inkubuje sa pri teplote 35 °C ± 2 °C v utesnených nádobách s testovanou látkou v koncentrácii 20 – 100 mg C/l maximálne 60 dní. Umožní sa meranie aktivity kalu, a to tak, že sa súbežne analyzujú slepé kontrolné vzorky s kalovým inokulom v médiu, ale bez testovanej látky.

5. Odmeria sa zvýšenie tlaku v uzavretom priestore nad kvapalinou v nádobách v dôsledku tvorby oxidu uhličitého a metánu. Veľká časť vytvoreného CO_2 sa za podmienok testu rozpustí v kvapalnej fáze alebo transformuje na uhličitan alebo hydrogénuhličitan. Tento anorganický uhlík sa odmeria na konci testu.

6. Množstvo uhlíka (anorganického a metánu), ktoré vzniklo biodegradáciou testovanej látky, sa vypočíta z čistej tvorby plynu a čistej tvorby IC v kvapalnej fáze navyše oproti hodnotám v slepej kontrolnej vzorke. Rozsah biodegradácie sa vypočíta z celkového vytvoreného IC a uhlíka v metáne ako percento z nameraného alebo vypočítaného množstva uhlíka pridaného ako testovaná látka. V priebehu biodegradácie sa môžu vykonávať iba priebežné merania tvorby plynu. Špecifickými analýzami možno navyše stanoviť primárnu biodegradáciu na začiatku a na konci testu.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

7. Na správnu interpretáciu výsledkov je potrebné poznať čistotu, rozpustnosť vo vode, prchavosť a adsorpčné vlastnosti testovanej látky. Je potrebné poznať obsah organického uhlíka (hmotnostné percento) v testovanej látke buď podľa jej chemickej štruktúry, alebo na základe merania. V prípade prchavých testovaných látok je pri rozhodovaní o vhodnosti testu užitočná nameraná alebo vypočítaná Henryho konštanta. Pri výbere vhodnej testovanej koncentrácie a pri interpretácii výsledkov poukazujúcich na slabú biodegradovateľnosť sú užitočné informácie o toxicite testovanej látky pre anaeróbne baktérie. Pokiaľ nie je známe, že testovaná látka nemá na anaeróbnu mikrobiálnu činnosť inhibičné účinky, odporúča sa zahrnúť kontrolu inhibície [pozri bod 21 a normu ISO 13641-1 (12)].

([1]) Spracovaný kal je zmesou usadených fáz splaškovej vody a aktivovaného kalu, ktoré sa inkubovali v anaeróbnej vyhnívacej nádrži pri teplote približne 35 °C s cieľom znížiť biomasu a zápach a zlepšiť odvodňovaciu schopnosť kalu. Skladá sa zo spojenia anaeróbnych fermentačných a metanogénnych baktérií vytvárajúcich oxid uhličitý a metán (11).

▼M6

UPLATNITEĽNOSŤ TESTOVACEJ METÓDY

8. Testovaciu metódu možno použiť na látky rozpustné vo vode. Možno ju použiť aj na slabo rozpustné a nerozpustné látky za predpokladu, že sa použije metóda presného dávkovania [pozri napr. normu ISO 10634 (13)]. V prípade prchavých látok je vo všeobecnosti nutné rozhodovať sa v každom jednotlivom prípade osobitne. Môže byť potrebné prijať osobitné opatrenia, napríklad neuvoľňovať počas testu plyn.

REFERENČNÉ LÁTKY

9. Na účely kontroly postupu sa súbežne so štandardným testovaním testuje aj referenčná látka s použitím vhodných nádob. Príkladmi sú fenol, benzoan sodný a polyetylénglykol 400, pri ktorých sa očakáva degradácia viac než 60 % teoretickej tvorby plynu (t. j. metánu a anorganického uhlíka) do 60 dní (3) (14).

REPRODUKOVATEĽNOSŤ VÝSLEDKOV TESTU

10. V medzinárodnom kruhovom teste (14) sa dosiahla dobrá reprodukovateľnosť merania tlaku plynu medzi troma replikátmi nádob. Relatívna štandardná odchýlka (variačný koeficient, COV) bola väčšinou nižšia ako 20 %, hoci táto hodnota sa často zvýšila na > 20 % v prítomnosti toxických látok alebo ku koncu 60-dňového inkubačného obdobia. Väčšie odchýlky sa zistili aj v nádobách s objemom < 150 ml. Konečné hodnoty pH testovacieho média boli v rozmedzí 6,5 – 7,0.

11. V kruhovom teste sa získali tieto výsledky:

Testovaná látka	Celkové údaje n_1	Priemerná degradácia (z celkových údajov) (%)	Relatívna štandardná odchýlka (z celkových údajov) (%)	Platné údaje n2	Priemerná degradácia (z platných údajov) (%)	Relatívna štandardná odchýlka (z platných údajov) (%)	Údaje > 60 % degradácia v platných testoch n_3
Kyselina palmitová	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polyetylénglykol 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Podiel n_2

12. Variačné koeficienty pre priemery všetkých hodnôt získaných s kyselinou palmitovou a polyetylénglykolom 400 boli až 45 % (n = 36), resp. 35 % (n = 38). Keď sa vylúčili hodnoty < 40 % a > 100 % (v prvom prípade sa predpokladá, že sú dôsledkom suboptimálnych podmienok, v druhom sú dôvody neznáme), hodnoty COV sa znížili na 26 %, resp. 23 %. Podiel „platných“ hodnôt znamenajúcich aspoň 60 % degradáciu bol 70 % v prípade kyseliny palmitovej a 83 % v prípade polyetylénglykolu 400. Podiel percentuálnej biodegradácie odvodenej z meraní DIC bol pomerne nízky, ale variabilný. V prípade kyseliny palmitovej bol rozsah 0 – 35 %, priemer 12 % a hodnota COV 92 %, v prípade polyetylénglykolu 400 bol rozsah 0 – 40 %, priemer 24 % a hodnota COV 54 %.

OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Prístroje

13. Potrebné je bežné laboratórne vybavenie a toto:

a) inkubátor – odolný proti elektrickému výboju a regulovaný na teplotu 35 °C ± 2 °C,

▼M6

b) sklenené testovacie nádoby odolné proti tlaku vhodnej nominálnej veľkosti ([1]), každá s plynotesnou priehradkou schopnou vydržať tlak približne 2 bary. Objem uzavretého priestoru nad kvapalinou by mal byť aspoň 10 – 30 % celkového objemu. Ak sa bioplyn uvoľňuje pravidelne, vhodný objem uzavretého priestoru nad kvapalinou je približne 10 %, ale ak sa plyn uvoľňuje len na konci testu, vhodný objem je 30 %. Keď sa tlak uvoľňuje v každom čase odberu vzoriek, odporúča sa použiť sklenené sérové fľaše s nominálnym objemom 125 ml, celkovým objemom približne 160 ml, utesnené sérovou priehradkou ([2]) a zahnutými hliníkovými krúžkami.

c) zariadenie na meranie tlaku ([3]) prispôsobené tak, aby umožňovalo meranie a odvetrávanie vzniknutého plynu, napríklad ručný presný tlakomer pripojený k vhodnej injekčnej ihle. Trojcestný plynotesný ventil uľahčuje uvoľňovanie nadmerného tlaku (dodatok 1). Je nutné použiť hadičky a ventil snímača tlaku s čo najnižším vnútorným objemom, aby boli chyby vzniknuté zanedbaním objemu zariadenia zanedbateľné,

Poznámka – Hodnoty tlaku sa používajú priamo na výpočet množstva uhlíka vytvoreného v uzavretom priestore nad kvapalinou (body 42 až 44). Alternatívne možno hodnoty tlaku pomocou prevodového grafu previesť na objemy (pri teplote 35 °C a atmosférickom tlaku) vytvoreného plynu. Tento graf sa vytvorí z údajov získaných vstreknutím známych objemov plynného dusíka do série testovacích nádob (napr. sérových fliaš) pri teplote 35 ± 2 °, pričom sa zaznamenajú hodnoty vzniknutého stabilizovaného tlaku (pozri dodatok 2). Výpočet je uvedený v poznámke v bode 44.

Varovanie – dbajte na to, aby pri používaní mikrostriekačiek nedošlo k poraneniu ihlou.

d) analyzátor uhlíka vhodný na priame stanovenie anorganického uhlíka v rozsahu od 1 mg/l do 200 mg/l,

e) striekačky s vysokou presnosťou na plynné a kvapalné vzorky,

f) magnetické miešadlá a miešadielka (voliteľné),

g) rukavicový box (odporúčané).

Reaktanty

14. Vždy sa používajú analyticky čisté reaktanty.

([1]) Odporúčaná veľkosť je 0,1 litra až 1 liter.

([2]) Odporúča sa použiť plynotesnú silikónovú priehradku. Ďalej sa odporúča, aby sa otestovala plynotesnosť uzáverov, najmä priehradiek z butylového kaučuku, lebo viaceré komerčne dostupné priehradky nie sú dostatočne plynotesné proti metánu a niektoré priehradky nezostanú tesné, keď sa v podmienkach testu prepichnú ihlou.

([3]) Zariadenie by sa malo používať a kalibrovať v pravidelných intervaloch podľa pokynov výrobcu. Ak sa použije tlakomer predpísanej kvality, napr. obalený oceľovou membránou, kalibrácia v laboratóriu nie je potrebná. Presnosť kalibrácie je možné skontrolovať v laboratóriu pomocou jednobodového merania pri tlaku 1×10^5 Pa porovnaním s tlakomerom s mechanickým displejom. Ak sa tento bod odmeria správne, nezmení sa ani lineárnosť. Ak sa použijú iné meracie prístroje (bez kalibrácie osvedčenej výrobcom), odporúča sa kalibrácia v celom rozsahu v pravidelných intervaloch.

▼M6

Voda

15. Destilovaná alebo deionizovaná voda (odkysličená čerením plynným dusíkom obsahujúcim menej než 5 µl/l kyslíka), ktorá obsahuje menej než 2 mg/l rozpusteného organického uhlíka (DOC).

Testovacie médium

16. Pripravte riediace médium tak, aby obsahovalo tieto zložky v uvedenom množstve:

Bezvodý dihydrogénfosforečnan draselný (KH_2PO_4)	0,27 g
Dodekahydrát hydrogénfosforečnanu disodného ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$))	1,12 g
Chlorid amónny (NH_4Cl)	0,53 g
Dihydrát chloridu vápenatého ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,075 g
Hexahydrát chloridu horečnatého ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,10 g
Tetrahydrát chloridu železnatého ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,02 g
Resazurín (indikátor kyslíka)	0,001 g
Nonahydrát sulfidu sodného ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	0,10 g
Zásobný roztok stopových prvkov (voliteľné, bod 18)	10 ml
Pridajte odkysličenú vodu (bod 15)	do 1 litra

Poznámka: Mal by sa použiť čerstvý sulfid sodný alebo by sa pred použitím mal premyť a vysušiť, aby mal dostatočnú redukčnú kapacitu. Test možno vykonať bez použitia rukavicového boxu (pozri bod 26). V takom prípade by sa konečná koncentrácia sulfidu sodného v médiu mala zvýšiť na 0,20 g $Na_2S \cdot 9H_2O$ na liter. Sulfid sodný sa môže pridať aj z vhodného anaeróbneho zásobného roztoku cez priehradku uzavretých testovacích nádob, lebo týmto postupom sa zníži riziko oxidácie. Sulfid sodný sa môže nahradiť citranom titanitým, ktorý sa pridáva cez priehradku uzavretých testovacích nádob v konečnej koncentrácii 0,8 – 1,0 mmol/l. Citran titanitý je vysoko účinné redukčné činidlo s nízkou toxicitou, ktoré sa pripravuje takto: Rozpustite 2,94 g dihydrátu citranu sodného v 50 ml odkysličenej vody (aby sa získal roztok 200 mmol/l) a pridajte 5 ml 15 % (hmotnosť/objem) roztoku chloridu titanitého. Neutralizujte anorganickými zásadami na pH 7 ± 0,2 a pridajte do vhodnej nádoby pod prúdom dusíka. Koncentrácia citranu titanitého v tomto zásobnom roztoku je 164 mmol/l.

17. Zmiešajte zložky testovacieho média s výnimkou redukčného činidla (sulfid sodný alebo citran titanitý) a bezprostredne pred použitím čerte roztok plynným dusíkom asi 20 minút, aby sa odstránil kyslík. Potom bezprostredne pred použitím média pridajte vhodný objem čerstvo pripraveného roztoku redukčného činidla (pripraveného v odkysličenej vode). Podľa potreby upravte pH média zriedenou anorganickou kyselinou alebo zásadou na 7 ± 0,2.

▼M6

Zásobný roztok stopových prvkov (voliteľné)

18. Odporúča sa, aby testovacie médium obsahovalo tieto stopové prvky na zlepšenie procesov anaeróbnej degradácie, najmä ak sa používajú nízke koncentrácie (napr. 1 g/l) inokula (11).

Tetrahydrát chloridu manganatého ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50 mg
Kyselina boritá (H_3BO_3)	5 mg
Chlorid zinočnatý ($ZnCl_2$)	5 mg
Chlorid meďnatý ($CuCl_2$)	3 mg
Dihydrát molybdénanu disodného ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	1 mg
Hexahydrát chloridu kobaltnatého ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	100 mg
Hexahydrát chloridu nikeltnatého ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	10 mg
Seleničitan disodný (Na_2SeO_3)	5 mg
Pridajte odkysličenú vodu (bod 15)	do 1 litra

Testovaná látka

19. Pridajte testovanú látku ako zásobný roztok, suspenziu, emulziu alebo priamo ako tuhú alebo kvapalnú látku, alebo absorbovanú na filter zo sklených vlákien, aby sa dosiahla koncentrácia maximálne 100 mg/l organického uhlíka. Ak sa používajú zásobné roztoky, pripravte vhodný roztok vo vode (bod 15) (predtým odkysličenej čerením plynným dusíkom) takej sily, aby bol pridaný objem nižší ako 5 % celkového objemu reakčnej zmesi. Podľa potreby upravte pH zásobného roztoku na 7 ± 0,2. V prípade testovaných látok, ktoré sú nedostatočne rozpustné vo vode, si prečítajte normu ISO 10634 (13). Ak sa použije rozpúšťadlo, pripravte ďalšiu kontrolnú vzorku, v ktorej sa do inokulovaného média pridá len rozpúšťadlo. Nemali by sa používať organické rozpúšťadlá, o ktorých sa vie, že inhibujú tvorbu metánu, ako je chloroform a tetrachlórmetán.

Varovanie – s toxickými testovanými látkami a testovanými látkami, ktorých vlastnosti nie sú známe, zaobchádzajte opatrne.

Referenčné látky

20. Na kontrolu postupu sa úspešne používajú referenčné látky ako benzoan sodný, fenol a polyetylénglykol 400, ktoré sa v priebehu 60 dní biodegradujú na viac ako 60 %. Pripravte zásobný roztok (v odkysličenej vode) zvolenej referenčnej látky rovnakým spôsobom ako v prípade testovanej látky a podľa potreby upravte pH na 7 ± 0,2.

Kontrola inhibície (podmienené)

21. Na účely získania informácií o toxicite testovanej látky pre anaeróbne mikroorganizmy s cieľom nájsť najvhodnejšiu testovanú koncentráciu pridajte do nádoby obsahujúcej testovacie médium (pozri bod 16) testovanú látku a referenčnú látku v rovnakej koncentrácii, v akej sa pridáva v rámci samotného testu [pozri body 19 a 20 a normu ISO 13641-1 (12)].

▼M6

Spracovaný kal

22. Odoberte spracovaný kal z vyhnívacej nádrže v čistiarni odpadových vôd, ktorá spracúva prevažne odpadové vody z domácností. Kal by sa mal úplne charakterizovať a do správy by sa mali uviesť základné informácie o ňom (pozri bod 54). Ak sa zamýšľa použiť upravené inokulum, možno uvažovať o použití spracovaného kalu z čistiarne priemyselných splaškových vôd. Na odber spracovaného kalu použite fľaše so širokým hrdlom vyrobené z polyetylénu s vysokou hustotou alebo z podobného materiálu, ktorý sa môže rozširovať. Kal naplňte približne do 1 cm od horného okraja fliaš a hermeticky uzavrite, najlepšie bezpečnostným ventilom. Po preprave do laboratória možno odobratý kal priamo použiť alebo umiestniť do laboratórnej vyhnívacej nádrže. Nadmerné množstvo bioplynu uvoľnite opatrným otvorením fliaš s kalom. Prípadne možno ako zdroj inokula použiť anaeróbny kal vytvorený v laboratóriu, ale jeho spektrum aktivity môže byť narušené.

Varovanie – spracovaný kal vytvára horľavé plyny, ktoré predstavujú riziko vzniku požiaru a výbuchu. Obsahuje aj potenciálne patogénne organizmy, takže pri manipulácii s ním prijmite vhodné preventívne opatrenia. Z bezpečnostných dôvodov nepoužívajte na odber kalu sklenené nádoby.

23. Možno uvažovať o predspracovaní kalu, aby sa znížila tvorba plynu v pozadí a obmedzil vplyv slepých kontrolných vzoriek. Ak sa vyžaduje predspracovanie, kal by sa mal nechať vyhnívať bez pridania živín alebo substrátov pri teplote 35 °C ± 2 °C maximálne sedem dní. Zistilo sa, že predspracovanie počas približne piatich dní zvyčajne vedie k optimálnemu poklesu tvorby plynu v slepej vzorke bez neprijateľného predĺženia lag fázy alebo inkubačného obdobia počas testovacej fázy alebo bez straty pôsobenia v prípade malého počtu testovaných látok.

24. V prípade testovaných látok, ktoré sú alebo by mohli byť slabo biodegradovateľné, zvážte predexpozíciu kalu testovanej látke, aby sa získalo lepšie prispôsobené inokulum. V takom prípade pridajte testovanú látku s koncentráciou organického uhlíka 5 – 20 mg/l do spracovaného kalu a inkubujte až dva týždne. Pred použitím predexponovaný kal opatrne premyte (pozri bod 25) a do protokolu o skúške uveďte podmienky predexpozície.

Inokulum

25. Bezprostredne pred použitím premyte kal (pozri body 22 až 24), aby sa koncentrácia IC v konečnej testovacej suspenzii znížila na menej ako 10 mg/l. Odstreďte kal v utesnených skúmavkách (napr. 3 000 g počas 5 minút) a odoberte supernatant. Suspendujte výslednú peletu v odkysličenom médiu (body 16 a 17), suspenziu znova odstreďte a odoberte supernatant. Ak sa hodnota IC dostatočne neznížila, postup premývania kalu možno zopakovať maximálne dvakrát. Zdá sa, že to nemá nepriaznivý vplyv na mikroorganizmy. Napokon peletu suspendujte v požadovanom objeme testovacieho média a stanovte celkovú koncentráciu tuhých látok [napr. ISO 11923 (15)]. Konečná celková koncentrácia tuhých látok v testovacích nádobách musí byť v rozsahu od 1 g/l do 3 g/l (alebo približne 10 % koncentrácie v nezriedenom spracovanom kale). Uvedené činnosti vykonajte tak, aby sa kal dostal do minimálneho kontaktu s kyslíkom (napr. s použitím dusíkatej atmosféry).

▼**M6**

POSTUP TESTOVANIA

26. Vykonajte nasledujúce úvodné postupy s využitím metód na udržanie čo najmenšieho možného kontaktu medzi spracovaným kalom a kyslíkom. Napríklad môže byť potrebné pracovať v rukavicovom boxe v dusíkatej atmosfére a/alebo prefúknuť fľaše dusíkom (4).

Príprava testovacích a kontrolných skúšok

27. Pripravte aspoň tri replikáty testovacích nádob [pozri bod 13 písm. b)] pre komory s testovanou látkou, slepými kontrolnými vzorkami, referenčnou látkou, kontrolou inhibície (podmienené) a kontrolou tlaku (voliteľný postup) (pozri body 7, 19 až 21). Možno pripraviť aj ďalšie nádoby na účely hodnotenia primárnej biodegradácie pomocou špecifických analýz testovanej látky. Rovnaký súbor slepých kontrolných vzoriek možno použiť pre viaceré testované látky v tom istom teste, pokiaľ je objem uzavretého priestoru nad kvapalinou rovnaký.

28. Pripravte zriedené inokulum a pridajte ho do nádob, napr. pomocou pipety so širokým otvorom. Alikvotné časti dobre premiešaného inokula (bod 25) pridávajte tak, aby koncentrácia tuhých látok bola vo všetkých nádobách rovnaká (medzi 1 g/l a 3 g/l). Pridajte zásobné roztoky testovanej a referenčnej látky, pričom podľa potreby najskôr upravte pH na 7 ± 0,2. Testovaná látka a referenčná látka by sa mali pridať s použitím najvhodnejšieho spôsobu pridania (bod 19).

29. Testovaná koncentrácia organického uhlíka by zvyčajne mala byť medzi 20 a 100 mg/l (bod 4). Ak je testovaná látka toxická, testovaná koncentrácia by sa mala znížiť na 20 mg C/l alebo aj menej, ak sa má merať len primárna biodegradácia pomocou špecifických analýz. Treba poznamenať, že variabilita výsledkov testu sa zvyšuje pri nižších testovaných koncentráciách.

30. V prípade slepých nádob pridajte namiesto zásobného roztoku, suspenzie alebo emulzie rovnocenné množstvo nosiča použitého na dávkovanie testovanej látky. Ak sa testovaná látka aplikovala pomocou filtrov zo sklených vlákien alebo organických rozpúšťadiel, pridajte do slepých nádob filter alebo rovnocenný objem odpareného rozpúšťadla. Pripravte navyše jeden replikát s testovanou látkou na odmeranie hodnoty pH. Podľa potreby upravte pH na 7 ± 0,2 pomocou malého množstva zriedenej anorganickej kyseliny alebo zásady. Do všetkých testovacích nádob sa má pridať rovnaké množstvo neutralizačného činidla. Nemalo by to však byť potrebné, lebo hodnota pH zásobných roztokov testovanej látky a referenčnej látky už bola upravená (pozri body 19 a 20). Ak sa má merať primárna biodegradácia, má sa odobrať vhodná vzorka z nádoby na kontrolu pH alebo z ďalšej testovacej nádoby a pomocou špecifických analýz sa má odmerať koncentrácia testovanej látky. Ak je potrebné reakčné zmesi premiešať, do všetkých nádob možno pridať zakryté magnety (voliteľné).

31. Zabezpečte, aby boli celkový objem kvapaliny V_l a objem uzavretého priestoru nad kvapalinou V_h vo všetkých nádobách rovnaké. Hodnoty V_l a V_h si poznačte a uveďte do správy. Každá nádoba sa má utesniť plynotesnou priehradkou a preniesť z rukavicového boxu (pozri bod 26) do inkubátora [pozri bod 13 písm. a)].

▼M6

Nerozpustné testované látky

32. Priamo do pripravených nádob pridajte odvážené množstvá látok slabo rozpustných vo vode. Ak je potrebné použiť rozpúšťadlo (pozri bod 19), preneste roztok alebo suspenziu testovanej látky do prázdnych nádob. Ak je to možné, rozpúšťadlo nechajte odpariť zavedením plynného dusíka do nádob a potom pridajte ostatné zložky, teda zriedený kal (bod 25) a podľa potreby odkysličenú vodu. Je potrebné pripraviť aj doplnkovú kontrolnú vzorku s rozpúšťadlom (pozri bod 19). Ďalšie metódy pridávania nerozpustných látok nájdete v norme ISO 10634 (13). Kvapalné testované látky sa môžu pridávať striekačkou do úplne pripravených utesnených nádob, ak možno očakávať, že počiatočná hodnota pH nepresiahne 7 ± 1. V opačnom prípade použite postup opísaný vyššie (pozri bod 19).

Inkubácia a meranie tlaku plynu

33. Inkubujte pripravené nádoby pri teplote 35 °C ± 2 °C počas približne 1 hodiny, aby sa dosiahol rovnovážny stav, a uvoľnite nadmerný plyn do atmosféry napríklad pretrepaním každej nádoby tak, že ihla tlakomera (bod 13) sa zavedie cez tesnenie a ventil sa otvorí, kým tlakomer neukáže nulu. Ak je v tejto fáze alebo pri uskutočňovaní priebežných meraní tlak v uzavretom priestore nad kvapalinou nižší ako atmosférický tlak, je potrebné zaviesť plynný dusík, aby sa atmosférický tlak obnovil. Zatvorte ventil [pozri bod 13 písm. c)] a pokračujte v inkubácii v tme, pričom zabezpečte, aby sa všetky časti nádob udržiavali pri teplote vyhnívania. Po inkubácii pozorujte nádoby počas 24 – 48 hodín. Nádoby vyraďte, ak má obsah nádob zreteľné ružové zafarbenie v supernatante, t. j., ak sa zmenila farba resazurínu (pozri bod 16), čo poukazuje na prítomnosť kyslíka (pozri bod 50). Hoci malé množstvo kyslíka je systém schopný tolerovať, vyššie koncentrácie môžu výrazne inhibovať priebeh anaeróbnej degradácie. Občasné vyradenie jednej nádoby zo súboru troch replikátov je prijateľné, ale v prípade výskytu viacerých takých prípadov je nutné preskúmať experimentálne postupy a zopakovať test.

34. Opatrne premiešajte obsah každej nádoby miešaním alebo trasením počas niekoľkých minút aspoň dva- alebo trikrát za týždeň a krátko pred jednotlivými meraniami tlaku. Trasením sa inokulum resuspenduje a dosiahne sa rovnováha plynov. Všetky merania tlaku by sa mali vykonať rýchlo, lebo v testovacích nádobách môže dôjsť k zníženiu teploty, čo vedie k nesprávnym údajom. Počas merania tlaku sa má celá testovacia nádoba vrátane uzavretého priestoru nad kvapalinou udržiavať pri teplote vyhnívania. Tlak plynu odmerajte napríklad zavedením injekčnej ihly pripojenej k tlakomeru cez priehradku [bod 13 písm. c)]. Treba dávať pozor, aby sa do injekčnej ihly nedostala voda. Ak sa to stane, mokré časti sa musia vysušiť a musí sa nasadiť nová ihla. Tlak sa meria v milibaroch (pozri bod 42). Tlak plynu v nádobách sa môže merať pravidelne, napr. raz týždenne, a prebytok plynu sa môže uvoľniť do okolia. Alternatívne sa tlak meria len na konci testu na stanovenie množstva vytvoreného bioplynu.

35. Odporúča sa vykonávať priebežné merania tlaku plynu, lebo zvýšenie tlaku poskytuje usmernenie o tom, kedy možno test ukončiť, a umožňuje sledovať kinetiku (pozri bod 6).

▼M6

36. Zvyčajne sa test ukončí po uplynutí inkubačného obdobia 60 dní, pokiaľ biodegradačná krivka získaná z meraní tlaku nedosiahla ešte predtým plató, teda stav, v ktorom sa dosiahla maximálna degradácia a biodegradačná krivka sa vyrovnala. Ak je hodnota plató nižšia ako 60 %, interpretácia je problematická, lebo to naznačuje, že sa mineralizovala iba časť molekuly alebo že došlo k chybe. Ak sa na konci zvyčajného inkubačného obdobia tvorí plyn, ale zjavne sa ešte nedosiahla fáza plató, treba zvážiť predĺženie testu na overenie, či sa dosiahne plató (> 60 %).

Meranie anorganického uhlíka

37. Na konci testu po poslednom meraní tlaku plynu nechajte kal usadiť. Postupne otvorte všetky nádoby a ihneď odoberte vzorku na stanovenie koncentrácie (mg/l) anorganického uhlíka (IC) v supernatante. Supernatant sa nemá odstreďovať ani filtrovať, lebo by došlo k neprijateľnej strate rozpusteného oxidu uhličitého. Ak supernantant nemožno analyzovať ihneď po odbere, na maximálne dva dni ho uskladnite v utesnenej fľaštičke bez priestoru nad kvapalinou v chlade pri teplote 4 °C. Po odmeraní hodnoty IC odmerajte a zaznamenajte hodnotu pH.

38. Alternatívne možno hodnotu IC v supernatante stanoviť nepriamo prostredníctvom uvoľnenia rozpusteného IC ako oxidu uhličitého, ktorý možno odmerať v uzavretom priestore nad kvapalinou. Po poslednom meraní tlaku plynu upravte tlak v každej testovacej nádobe na atmosférický tlak. Okyslite obsah každej nádoby približne na pH 1 pridaním koncentrovanej anorganickej kyseliny (napr. H_2SO_4) cez priehradku utesnených nádob. Za pretrepávania inkubujte nádoby pri teplote 35 °C ± 2 °C počas približne 24 hodín a tlakomerom odmerajte tlak plynu v dôsledku vzniknutého oxidu uhličitého.

39. Podobné údaje získajte aj pre príslušné nádoby so slepou vzorkou, referenčnou látkou a kontrolou inhibície, ak sa použila (pozri bod 21).

40. V niektorých prípadoch, najmä ak sa pre viaceré testované látky použijú rovnaké kontrolné nádoby, treba podľa potreby zvážiť merania priebežných koncentrácií IC v testovacích a kontrolných nádobách. V takom prípade sa má pripraviť dostatočný počet nádob na všetky priebežné merania. Tento postup sa uprednostňuje pred odobratím všetkých vzoriek iba z jednej nádoby. To možno urobiť len vtedy, keď sa požadovaný objem na analýzu DIC nepovažuje za príliš vysoký. Meranie DIC by sa malo uskutočniť po meraní tlaku plynu bez uvoľnenia prebytočného plynu podľa opisu ďalej:

— striekačkou odoberte čo najmenší objem vzoriek supernatantu cez priehradku bez otvorenia nádob a stanovte hodnotu IC vzorky,

— po odobratí vzorky sa prebytok plynu uvoľní alebo neuvoľní,

— treba vziať do úvahy, že aj malé zníženie objemu supernatantu (napr. o 1 %) môže spôsobiť značné zvýšenie objemu plynu v uzavretom priestore nad kvapalinou (V_h),

— rovnice (pozri bod 44) sa podľa potreby upravia zvýšením hodnoty V_h v rovnici 3.

▼M6

Špecifické analýzy

41. Ak sa má stanoviť primárna anaeróbna degradácia (pozri bod 30), na začiatku a na konci testu odoberte z nádob obsahujúcich testovanú látku vhodný objem vzorky na špecifické analýzy. V takom prípade majte na zreteli, že objem uzavretého priestoru nad kvapalinou (V_h) a objem kvapaliny (V_l) sa zmenia a zohľadnite to pri výpočte výslednej tvorby plynu. Alternatívne možno vzorky na špecifické analýzy odobrať z ďalších zmesí vopred pripravených na tento účel (bod 30).

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

42. Z praktických dôvodov sa tlak plynu meria v milibaroch (1 mbar = 1 h Pa = 10^2 Pa, 1 Pa = 1 N/m^2), objem v litroch a teplota v stupňoch Celzia.

Uhlík v uzavretom priestore nad kvapalinou

43. Keďže 1 mol metánu i 1 mol oxidu uhličitého obsahujú 12 g uhlíka, hmotnosť uhlíka v danom objeme uvoľneného plynu sa môže vyjadriť ako:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Rovnica [1]}$$

kde:

m = hmotnosť uhlíka (mg) v danom objeme uvoľneného plynu,

12 = relatívna atómová hmotnosť uhlíka,

n = počet molov plynu v danom objeme.

Ak sa v značných množstvách tvorí iný plyn ako metán alebo oxid uhličitý (napr. N_2O), vzorec [1] by sa mal upraviť tak, aby opisoval možnosť účinkov vytvorených plynov.

44. Podľa zákonov o plynoch možno n vyjadriť ako:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Rovnica [2]}$$

kde:

p = tlak plynu (pascaly),

V = objem plynu (m^3),

R = molárna plynová konštanta [8,314 J/(mol K)],

T = inkubačná teplota (kelviny).

Kombináciou rovníc [1] a [2] a racionalizáciou s cieľom vyjadriť tvorbu plynu v slepej kontrolnej vzorke dostaneme:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0{,}1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Rovnica [3]}$$

kde:

m_h = hmotnosť čistého uhlíka vytvoreného ako plyn v uzavretom priestore nad kvapalinou (mg),

Δp = priemerný rozdiel medzi počiatočným a konečným tlakom v testovacích nádobách mínus príslušný priemer v slepých nádobách (milibary),

▼M6

V_h = objem uzavretého priestoru nad kvapalinou v nádobe (l),

0,1 = prevod pre newtony/m^2 na milibary a pre m^3 na litre.

Rovnica [4] by sa mala použiť pri normálnej inkubačnej teplote 35 °C (308 K):

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot V_h) \qquad \text{Rovnica [4]}$$

Poznámka: Alternatívny výpočet objemu. Hodnoty na tlakomeri sa prevedú na ml vytvoreného plynu s použitím štandardnej krivky vytvorenej zakreslením vstreknutého objemu (ml) v závislosti od hodnoty na meracom prístroji (dodatok 2). Počet molov (n) plynu v uzavretom priestore nad kvapalinou v každej nádobe sa vypočíta vydelením kumulatívnej tvorby plynu (ml) číslom 25 286 ml/mol, čo je objem obsadený jedným molom plynu pri teplote 35 °C a štandardnom atmosférickom tlaku. Keďže 1 mol CH_4 i 1 mol CO_2 obsahujú 12 g uhlíka, množstvo uhlíka (mg) v uzavretom priestore nad kvapalinou (*mh*) je dané rovnicou [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \qquad \text{Rovnica [5]}$$

Racionalizácia s cieľom vyjadriť tvorbu plynu v slepej kontrolnej vzorke:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0{,}475\Delta V \qquad \text{Rovnica [6]}$$

kde:

m_h = hmotnosť čistého uhlíka vytvoreného ako plyn v uzavretom priestore nad kvapalinou (mg),

ΔV = priemerný rozdiel medzi objemom plynu vytvoreným v uzavretom priestore nad kvapalinou v testovacích nádobách a slepých kontrolných nádobách,

25286 = objem obsadený 1 molom plynu pri teplote 35 °C a tlaku 1 atmosféra.

45. Po biodegradácii možno podľa potreby vytvoriť graf kumulovaného zvýšenia tlaku D*p* (milibary) v závislosti od času. Z tejto krivky identifikujte a zaznamenajte lag fázu (dni). Lag fáza je čas od začiatku testu do začiatku významnej degradácie (príklad nájdete v dodatku 3). Ak sa odoberali a analyzovali priebežné vzorky supernatantu (pozri body 40, 46 a 47), možno namiesto len kumulatívneho tlaku vytvoriť graf pre celkový vytvorený C (v plyne plus v kvapaline).

Uhlík v kvapaline

46. Množstvo metánu v kvapaline sa neberie do úvahy, lebo je známe, že jeho rozpustnosť vo vode je veľmi nízka. Hmotnosť anorganického uhlíka v kvapaline v testovacích nádobách vypočítajte s použitím rovnice [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \qquad \text{Rovnica [7]}$$

kde:

m_l = hmotnosť anorganického uhlíka v kvapaline (mg),

C_{net} = koncentrácia anorganického uhlíka v testovacích nádobách mínus koncentrácia v kontrolných nádobách na konci testu (mg/l),

V_l = objem kvapaliny v nádobe (l).

▼M6

Celkový splynovaný uhlík

47. Celkovú hmotnosť splynovaného uhlíka v nádobe vypočítajte s použitím rovnice [8]:

$$m_t = m_h + m_l \qquad \text{Rovnica [8]}$$

kde:

m_t = celková hmotnosť splynovaného uhlíka (mg),

hodnoty m_h a m_l sú vymedzené vyššie.

Uhlík v testovanej látke

48. Hmotnosť uhlíka v testovacích nádobách vytvoreného z pridanej testovanej látky vypočítajte s použitím rovnice [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \qquad \text{Rovnica [9]}$$

kde:

m_v = hmotnosť uhlíka v testovanej látke (mg),

C_c = koncentrácia uhlíka v testovanej látke v testovacej nádobe (mg/l),

V_l = objem kvapaliny v testovacej nádobe (l).

Rozsah biodegradácie

49. Vypočítajte percento biodegradácie z plynu v uzavretom priestore nad kvapalinou pomocou rovnice [10] a celkové percento biodegradácie pomocou rovnice [11]:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \qquad \text{Rovnica [10]}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \qquad \text{Rovnica [11]}$$

kde:

D_h = biodegradácia z plynu v uzavretom priestore nad kvapalinou (%),

D_t = celková biodegradácia (%),

hodnoty m_h, m_v a m_t sú vymedzené vyššie.

Množstvo primárnej biodegradácie sa vypočíta z (voliteľných) meraní koncentrácie testovanej látky na začiatku a konci inkubácie pomocou rovnice [12]:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \qquad \text{Rovnica [12]}$$

kde:

D_p = primárna degradácia testovanej látky (%),

S_i = počiatočná koncentrácia testovanej látky (mg/l),

S_e = koncentrácia testovanej látky na konci (mg/l).

Ak metóda analýzy naznačuje významné koncentrácie testovanej látky v neupravenom inokulu anaeróbneho kalu, použite rovnicu [13]:

▼M6

$$D_p^{\,1} = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{Rovnica [13]}$$

kde:

$D_p^{\,1}$ = upravená primárna degradácia testovanej látky (%),

S_{ib} = počiatočná „zjavná“ koncentrácia testovanej látky v slepých kontrolných vzorkách (mg/l),

S_{eb} = „zjavná“ koncentrácia testovanej látky v slepých kontrolných vzorkách na konci (mg/l).

Validita výsledkov

50. Mali by sa použiť len hodnoty tlaku v nádobách, v ktorých sa neobjavilo ružové zafarbenie (pozri bod 33). Kontaminácia kyslíkom sa minimalizuje použitím vhodných metód manipulácie v anaeróbnom prostredí.

51. Treba mať na zreteli, že test je platný, keď referenčná látka dosiahne plató predstavujúce viac ako 60 % biodegradáciu ([1]).

52. Ak pH na konci testu prekročilo rozsah 7 ± 1 a došlo k nedostatočnej biodegradácii, zopakujte test so zvýšenou tlmivou kapacitou média.

Inhibícia degradácie

53. Tvorba plynu v nádobách obsahujúcich testovanú látku i referenčnú látku by mala byť minimálne rovnaká ako v nádobách obsahujúcich iba referenčnú látku, inak to môže znamenať, že dochádza k inhibícii tvorby plynu. V niektorých prípadoch bude tvorba plynu v nádobách obsahujúcich testovanú látku bez referenčnej látky nižšia ako v slepých kontrolných nádobách, čo naznačuje, že testovaná látka má inhibujúci účinok.

Protokol o skúške

54. Protokol o skúške musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— bežný názov, chemický názov, číslo CAS, štruktúrny vzorec a relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— čistota (nečistoty) testovanej látky.

Podmienky testu:

— objem zriedenej kvapaliny vo vyhnívacej nádobe (V_l) a objem uzavretého priestoru nad kvapalinou (V_h) v nádobe,

— opis testovacích nádob, hlavné charakteristiky merania bioplynu (napr. typ tlakomera) a analyzátora IC,

— aplikácia testovanej látky a referenčnej látky do testovacieho systému: použitá testovaná koncentrácia a prípadné použitie rozpúšťadiel,

— údaje o použitom inokule: názov čistiarne odpadových vôd, opis zdroja čistených odpadových vôd (napr. prevádzková teplota, retenčný čas kalu, prevažne odpadové vody z domácností atď.), koncentrácia, všetky informácie potrebné na odôvodnenie tohto postupu a informácie o prípadnej predúprave inokula (napr. predbežné vyhnívanie, predexpozícia),

— inkubačná teplota,

— počet replikátov.

([1]) Túto hodnotu je nutné prehodnotiť, ak sa použijú adsorpčné a nerozpustné referenčné chemikálie.

▼M6

Výsledky:

— hodnoty pH a IC na konci testu,

— koncentrácia testovanej látky na začiatku a konci testu, ak sa vykonalo špecifické meranie,

— všetky namerané údaje získané v nádobách s testovanou látkou, slepou vzorkou, referenčnou látkou, prípadne kontrolou inhibície [napr. tlak v milibaroch, koncentrácia anorganického uhlíka (mg/l)] vo forme tabuľky (namerané údaje pre kvapalinu a uzavretý priestor nad kvapalinou sa majú uviesť samostatne),

— štatistické spracovanie údajov, trvanie testu a graf biodegradácie testovanej látky, referenčnej látky a kontroly inhibície,

— percento biodegradácie testovanej látky a referenčnej látky,

— dôvody pre akékoľvek odmietnutie výsledkov testu,

— rozbor výsledkov.

LITERATÚRA

1. Kapitoly tejto prílohy:

   C.4, stanovenie ľahkej biodegradovateľnosti;

   C.9, biodegradácia – Zahn-Wellensov test;

   C.10, simulačný test – aeróbne čistenie odpadových vôd:

   A: Jednotky s technológiou aktivovaného kalu, B: Biofilmy

   C.11, biodegradácia – respiračno-inhibičný test aktivovaného kalu

2. OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Paríž

3. Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga,U., Steber, J., Reust, H. a Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527 – 1550. (publikované aj ako ECETOC Technical Report No. 28, jún 1988).

4. Shelton D.R. a 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. a McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Res. 13, 485 – 492.

6. Healy, J.B.Jr. a 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. a 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.

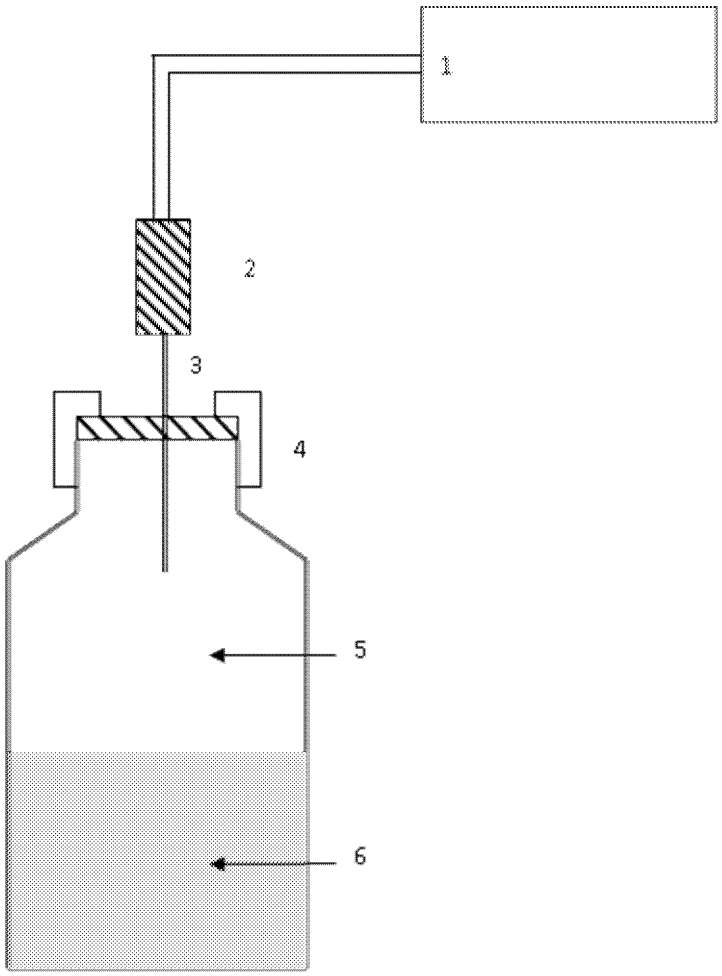
14. Pagga, U. a Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, 1499 – 1509.

15. International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Dodatok 1

Príklad prístroja na meranie tvorby bioplynu pomocou tlaku plynu



Legenda:

1 – Tlakomer

2 – Trojcestný plynotesný ventil

3 – Injekčná ihla

4 – Plynotesné tesnenie (zahnutý uzáver a priehradka)

5 – Uzavretý priestor nad kvapalinou (V_h)

6 – Inokulum spracovaného kalu (V_I)

Testovacie nádoby v prostredí s teplotou 35 °C ± 2 °C

▼M6

Dodatok 2

Prevod hodnôt na tlakomeri

Hodnoty na tlakomeri možno dať do súvislosti s objemami plynu prostredníctvom štandardnej krivky vytvorenej vstreknutím známych objemov vzduchu pri teplote 35 °C ± 2 °C do sérových fliaš, ktoré obsahujú objem vody rovný objemu reakčnej zmesi V_R:

— pridajte alikvotné časti vody V_R (ml) udržiavanej pri teplote 35 °C ± 2 °C do piatich sérových fliaš, utesnite fľaše a vložte ich na 1 hodinu do vodného kúpeľa pri teplote 35 °C, aby sa dosiahol rovnovážny stav,

— zapnite tlakomer, nechajte ho stabilizovať a nastavte ho na nulu,

— zaveďte injekčnú ihlu cez tesnenie jednej z fliaš, otvorte ventil a nechajte ho otvorený, kým na tlakomeri bude nula, a ventil zatvorte,

— zopakujte postup so zvyšnými fľašami,

— do každej fľaše vstreknite 1 ml vzduchu s teplotou 35 °C ± 2 °C. Zaveďte ihlu (na tlakomeri) cez tesnenie jednej z fliaš a nechajte hodnotu tlaku ustáliť. Zaznamenajte tlak, otvorte ventil a nechajte ho otvorený, kým na tlakomeri bude nula, a ventil zatvorte,

— zopakujte postup so zvyšnými fľašami,

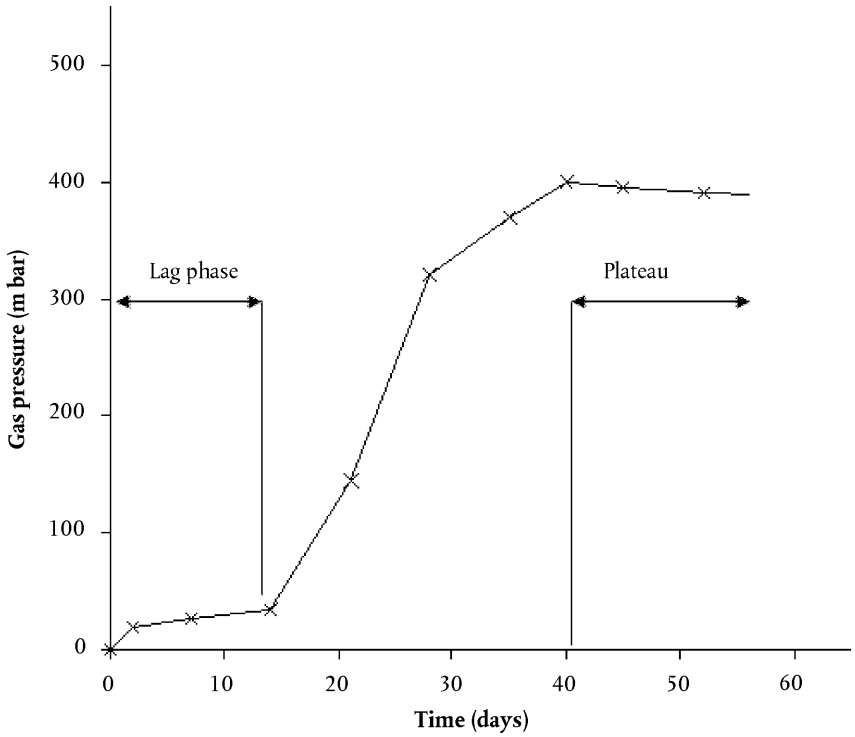
— zopakujte uvedený postup s použitím objemov 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml a 50 ml vzduchu,

— zostrojte prevodovú krivku tlaku (Pa) v závislosti od objemu vstreknutého plynu Vb (ml). Odpoveď prístroja je lineárna v rozsahu 0 – 70 000 Pa a 0 – 50 ml tvorby plynu.

▼**M6**

Dodatok 3

Príklad degradačnej krivky (kumulatívne čisté zvýšenie tlaku)



▼M6

Dodatok 4

Príklad kariet údajov pre test anaeróbnej degradácie – karta údajov pre testovanú látku

Laboratórium: ..... Testovaná látka: ..... Č. testu: .....

Teplota testu (°C): ..... Objem uzavretého priestoru nad kvapalinou (V_h): .....(l) Objem kvapaliny (V_l): .....(l)

Uhlík v testovanej látke $C_{c,v}$: .....(mg/l) m_v [1]: .....(mg)

Deň	p_1 (test) (mbar)	p_2 (test) (mbar)	p_3 (test) (mbar)	p (test) priemer (mbar)	p_4 (slepé) (mbar)	p_5 (slepé) (mbar)	p_6 (slepé) (mbar)	p (slepé) priemer (mbar)	p (čisté) test – slepé priemer (mbar)	Δp (čisté) kumulatívne (mbar)	m_h C v priest. nad kvap. [2] (mg)	D_h biodegradácia [3] (%)
	$C_{IC,\ 1}$ test (mg)	$C_{IC,\ 2}$ test (mg)	$C_{IC,\ 3}$ test (mg)	C_{IC} priemer testu (mg)	$C_{IC,\ 4}$ slepé (mg)	$C_{IC,\ 5}$ slepé (mg)	$C_{IC,\ 6}$ slepé (mg)	C_{IC} priemer v slepej vzorke (mg)	$C_{IC,\ net}$ test – slepé priemer (mg)	m_l kvapalný C [4] (mg)	m_t celkový C [5] (mg)	D_t biodegradácia [6] (%)
IC (koniec)												
pH (koniec)												

[1] Uhlík v testovacej nádobe, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

[2] Uhlík v uzavretom priestore nad kvapalinou, m_h (mg) pri normálnej inkubačnej teplote (35 °C): $m_h = 0{,}468\Delta p \times V_h$

[3] Biodegradácia vypočítaná z plynu v uzavretom priestore nad kvapalinou, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

[4] Uhlík v kvapaline, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$

[5] Celkový splynovaný uhlík, m_t (mg): $m_t + m_l$

[6] Celková biodegradácia, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

02008R0440 — SK — 16.10.2019 — 008.001 — 2374

▼M6

Laboratórium: ..... Referenčná látka: ..... Č. testu: .....

Teplota testu (°C): ..... Objem uzavretého priestoru nad kvapalinou (V_h): .....(l) Objem kvapaliny (V_l) .....(litre):

Uhlík v referenčnej látke $C_{c,v}$ .....(mg/l): m_v [1](mg):

Deň	p_1 (ref.) (mbar)	p_2 (ref.) (mbar)	p_3 (ref.) (mbar)	p (ref.) priemer (mbar)	p_4 (inhib.) (mbar)	p_5 (inhib.) (mbar)	p_6 (inhib.) (mbar)	p (inhib.) priemer (mbar)	p (ref.) ref. – slepé (mbar)	Δp (ref.) kumulatívne (mbar)	m_h C v priest. nad kvap. [2] (mg)	D_h biodegradácia [3] (%)
	$C_{IC,\ 1}$ ref. (mg)	$C_{IC,\ 2}$ ref. (mg)	$C_{IC,\ 3}$ ref. (mg)	C_{IC} priemer ref. (mg)	$C_{IC,\ 4}$ inhib. (mg)	$C_{IC,\ 5}$ inhib. (mg)	$C_{IC,\ 6}$ inhib. (mg)	C_{IC} priemer inhib. (mg)	$C_{IC,\ net}$ ref. – inhib. (mg)	m_l kvapalný C [4] (mg)	m_t celkový C [5] (mg)	D_t biodegradácia [6] (%)
IC (koniec)												
pH (koniec)												

([1]) Uhlík v testovacej nádobe, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$
([2]) Uhlík v uzavretom priestore nad kvapalinou, m_h (mg) pri normálnej inkubačnej teplote (35 °C): $m_h = 0{,}468\Delta p \times V_h$
([3]) Biodegradácia vypočítaná z plynu v uzavretom priestore nad kvapalinou, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$
([4]) Uhlík v kvapaline, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$
([5]) Celkový splynovaný uhlík, m_t (mg): $m_t + m_l$
([6]) Celková biodegradácia, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

▼M6

C.44. LÚHOVANIE V PÔDNYCH KOLÓNACH

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 312 (2004). Syntetické chemikálie sa do pôdy môžu dostať priamo zámernou aplikáciou (napr. agrochemikálie) alebo nepriamymi cestami (napr. postupnosťou odpadové vody → splaškový kal → pôda alebo vzduch → mokré/suché skládkovanie). Z hľadiska posúdenia rizika týchto chemikálií je dôležité odhadnúť ich potenciál transformácie v pôde a pohybu (lúhovania) do hlbších vrstiev pôdy a napokon do podzemnej vody.

2. K dispozícii je niekoľko metód na meranie potenciálu vylúhovania chemikálií v pôde pri riadených laboratórnych podmienkach, t. j. chromatografia na tenkej vrstve pôdy, chromatografia na hrubej vrstve pôdy, chromatografia v pôdnej kolóne a merania adsorpcie – desorpcie (1) (2). V prípade neionizovaných chemikálií možno použiť rozdeľovaciu konštantu n-oktanol – voda (P_{ow}), ktorá umožňuje skorý odhad ich potenciálu adsorpcie a vylúhovania (3) (4) (5).

3. Metóda opísaná v tejto testovacej metóde je založená na chromatografii v pôdnej kolóne s narušenou pôdou (vymedzenie pojmu pozri v dodatku 1). Uskutočnia sa dva druhy pokusov na stanovenie i) potenciálu vylúhovania testovanej chemikálie a ii) potenciálu vylúhovania produktov transformácie (štúdia s vyzretými rezíduami) v pôdach pri riadených laboratórnych podmienkach ([1]). Testovacia metóda je založená na existujúcich metódach (6) (7) (8) (9) (10) (11).

4. Účastníci seminára OECD o výbere pôd/sedimentov, ktorý sa uskutočnil v roku 1995 v talianskom meste Belgirate (12), sa dohodli na počte a druhoch pôd, ktoré možno použiť v tejto testovacej metóde. Boli schválené aj odporúčania na odber vzoriek pôdy, manipuláciu s nimi a ich skladovanie pri pokusoch s lúhovaním.

PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

5. Kolóny vyrobené z vhodného inertného materiálu (napr. sklo, nehrdzavejúca oceľ, hliník, teflón, PVC atď.) sa naplnia pôdou, potom sa nasýtia a nechajú dosiahnuť rovnovážny stav s použitím roztoku „umelého dažďa“ (vymedzenie pojmu pozri v dodatku 1). Následne sa nechajú odvodniť. Potom sa na povrch každej pôdnej kolóny aplikuje testovaná chemikália a/alebo vyzreté rezíduá testovanej chemikálie. Následne sa do pôdnych kolón aplikuje umelý dážď a odoberie sa výluh. Po procese lúhovania sa pôda vyberie z kolón a rozdelí na primeraný počet segmentov v závislosti od toho, aké informácie má štúdia priniesť. Každý segment pôdy a výluh sa potom analyzujú z hľadiska testovanej chemikálie a podľa potreby aj z hľadiska produktov transformácie alebo iných sledovaných chemikálií.

UPLATNITEĽNOSŤ TESTOVACEJ METÓDY

6. Testovacia metóda sa uplatňuje na testované chemikálie (neoznačené alebo rádioaktívne označené, napr. uhlíkom ^{14}C), pre ktoré existuje analytická metóda s dostatočnou presnosťou a citlivosťou. Testovacia metóda by sa nemala uplatňovať na chemikálie, ktoré sú prchavé z pôdy a vody, teda nezostávajú v pôde a/ani vo výluhu pri experimentálnych podmienkach tejto testovacej metódy.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

7. Na meranie vyplavovania látky zo sedimentu v pôdnych kolónach možno použiť neoznačené alebo rádioaktívne označené testované chemikálie. Rádioaktívne označený materiál sa vyžaduje na skúmanie lúhovania produktov

([1]) Štúdie lúhovania v kolóne zamerané na prípravky na ochranu plodín môžu poskytnúť informácie o mobilite testovanej chemikálie a produktoch jej transformácie a môžu doplniť štúdie sorpcie.

▼M6

transformácie (vyzretých rezíduí testovanej chemikálie) a na stanovenie hmotnostnej bilancie. Odporúča sa značkovanie izotopom ^{14}C, ale užitočné môžu byť aj iné izotopy, napr. ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Značka by sa podľa možnosti mala umiestniť do najstabilnejšej časti (najstabilnejších častí) molekuly. Čistota testovanej chemikálie by mala byť aspoň 95 %.

8. Väčšina chemikálií by sa mala aplikovať ako jedna látka. V prípade účinných látok v prípravkoch na ochranu rastlín však možno na skúmanie lúhovania východiskovej testovanej látky použiť aj zložené produkty. Ich testovanie je potrebné najmä v prípade, že sa predpokladá vplyv zmesi na rýchlosť uvoľňovania (napr. zrnité prípravky alebo prípravky s riadeným uvoľňovaním). Pokiaľ ide o osobitné požiadavky na koncepciu testu v prípade zmesí, môže byť užitočné poradiť sa pred vykonaním testu s regulačným orgánom. V prípade štúdií lúhovania vyzretých rezíduí by sa mala použiť čistá východisková testovaná látka.

9. Pred vykonaním testov lúhovania v pôdnych kolónach by podľa možnosti mali byť k dispozícii tieto informácie o testovanej chemikálii:

   1. rozpustnosť vo vode [testovacia metóda A.6] (13);

   2. rozpustnosť v organických rozpúšťadlách;

   3. tlak pary [testovacia metóda A.4] (13) a Henryho konštanta;

   4. rozdeľovacia konštanta n-oktanol – voda [testovacie metódy A.8 a A.24] (13);

   5. adsorpčný koeficient (K_d, K_f alebo K_{OC}) [testovacie metódy C.18 a/alebo C.19) (13);

   6. hydrolýza (testovacia metóda C.7) (13);

   7. disociačná konštanta (pK_a) (usmernenie OECD TG 112) (25);

   8. aeróbna a anaeróbna transformácia v pôde (testovacia metóda C.23) (13).

   Poznámka: Teplota, pri ktorej sa vykonali tieto merania, sa musí uviesť do príslušných protokoloch o skúške.

10. Množstvo testovanej chemikálie aplikovanej do pôdnych kolón by malo byť dostatočné na zistenie aspoň 0,5 % aplikovanej dávky v jednotlivých segmentoch. V prípade účinných chemikálií v prípravkoch na ochranu rastlín môže množstvo aplikovanej testovanej chemikálie zodpovedať maximálnej odporúčanej dávke na použitie (jedna aplikácia).

11. Musí byť k dispozícii vhodná analytická metóda na kvantifikáciu testovanej chemikálie a podľa potreby produktov jej transformácie v pôde a výluhu so známou správnosťou, presnosťou a citlivosťou. Mal by byť známy aj analytický detekčný limit testovanej chemikálie a významných produktov jej transformácie (zvyčajne aspoň všetkých produktov transformácie ≥10 % aplikovanej dávky pozorovanej v štúdiách spôsobov transformácie, ale podľa možnosti všetkých relevantných produktov transformácie) (pozri bod 17).

▼M6

REFERENČNÉ CHEMIKÁLIE

12. Na vyhodnotenie relatívnej mobility testovanej chemikálie v pôde by sa mali použiť referenčné chemikálie so známymi vlastnosťami lúhovania, ako sú atrazín alebo monurón, ktoré možno v teréne považovať za mierne lúhovacie látky (1) (8) (11). Na potvrdenie hydrodynamických vlastností pôdnej kolóny možno použiť aj nesorbčnú a nedegradovateľnú polárnu referenčnú chemikáliu (napr. trícium, bromid, fluoresceín, eozín), ktorou sa sleduje pohyb vody v kolóne.

13. Užitočné môžu byť aj analytické štandardné chemikálie, ktoré možno použiť na charakterizáciu a/alebo identifikáciu produktov transformácie v pôdnych segmentoch a vo výluhoch chromatografickými, spektroskopickými alebo inými relevantnými metódami.

VYMEDZENIE POJMOV A JEDNOTKY

14. Pozri dodatok 1.

KRITÉRIÁ KVALITY

Výťažok

15. Súčet percentuálnych podielov testovanej chemikálie v segmentoch pôdy a vo výluhu z kolóny po vylúhovaní predstavuje výťažok pokusu s lúhovaním. Výťažky by mali byť v rozpätí od 90 % do 110 % pre rádioaktívne označené chemikálie (11) a od 70 % do 110 % pre neoznačené chemikálie (8).

Opakovateľnosť a citlivosť analytickej metódy

16. Opakovateľnosť analytickej metódy na kvantifikáciu testovanej chemikálie a produktov transformácie možno overiť duplikátnou analýzou rovnakého extraktu segmentu pôdy alebo výluhu (pozri bod 11).

17. Detekčný limit (LOD) analytickej metódy pre testovanú chemikáliu a produkty transformácie by mal byť aspoň 0,01 mg $\cdot$ kg^{-1} v každom segmente pôdy alebo výluhu (ako testovaná chemikália) alebo 0,5 % aplikovanej dávky v jednotlivých segmentoch podľa toho, ktorá hodnota je nižšia. Mal by sa stanoviť aj kvantifikačný limit (LOQ).

OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Testovací systém

18. V teste sa použijú lúhovacie kolóny (rozdeliteľné alebo nerozdeliteľné) vyrobené z vhodného inertného materiálu (napr. sklo, nehrdzavejúca oceľ, hliník, teflón, PVC atď.) s vnútorným priemerom najmenej 4 cm a minimálnou výškou 35 cm. Materiály kolóny by sa mali otestovať na možné vzájomné pôsobenie s testovanou chemikáliou a/alebo produktmi jej transformácie. Príklady vhodných rozdeliteľných a nerozdeliteľných kolón sú uvedené v dodatku 2.

19. Na naplnenie a utlačenie pôdnych kolón sa používa lyžica, plunžer a vibračný prístroj.

20. Na aplikovanie umelého dažďa do pôdnych kolón možno použiť piestové alebo peristaltické čerpadlá, sprchové hlavice, Mariottove fľaše alebo jednoduchý prikvapkávací lievik.

▼M6

Laboratórne vybavenie a chemikálie

21. Vyžaduje sa štandardné laboratórne vybavenie, najmä:

    1. analytické prístroje, napríklad zariadenia GLC, HPLC a TLC vrátane príslušných detekčných systémov na analyzovanie označených alebo neoznačených chemikálií alebo na inverznú metódu riedenia izotopov;

    2. prístroje na účely identifikácie (napr. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR atď.);

    3. kvapalinové scintilačné počítadlo na rádioaktívne označené chemikálie;

    4. oxidačné činidlo na spaľovanie označeného materiálu;

    5. extrakčný prístroj (napr. odstredivkové skúmavky na extrakciu za studena a Soxhletov prístroj na kontinuálnu extrakciu s refluxom);

    6. zariadenia na koncentrovanie roztokov a extraktov (napr. rotačná odparka).

22. Medzi používané chemikálie patria: organické rozpúšťadlá analytickej čistoty, napr. acetón, metanol atď., scintilačná kvapalina, 0,01 M roztoku $CaCl_2$ v destilovanej alebo deionizovanej vode (= umelý dážď).

Testovaná chemikália:

23. Testovaná chemikália sa do pôdnej kolóny aplikuje rozpustená vo vode (deionizovanej alebo destilovanej). Ak je testovaná chemikália slabo rozpustná vo vode, možno ju aplikovať buď ako zložený produkt (podľa potreby po suspendovaní alebo emulgovaní vo vode), alebo v akomkoľvek organickom rozpúšťadle. Ak sa použije organické rozpúšťadlo, jeho množstvo by malo byť minimálne a malo by sa odpariť z povrchu pôdnej kolóny pred začiatkom lúhovania. Tuhé prípravky, napríklad granuly, by sa mali aplikovať v tuhej forme bez vody. Na dosiahnutie lepšej distribúcie na povrchu pôdnej kolóny možno zložený produkt pred aplikovaním zmiešať s malým množstvom kremenného piesku (napr. 1 g).

24. Množstvo testovanej chemikálie aplikovanej do pôdnych kolón by malo byť dostatočné na zistenie aspoň 0,5 % aplikovanej dávky v jednotlivých segmentoch. V prípade účinných chemikálií v prípravkoch na ochranu rastlín to môže byť založené na maximálnej odporúčanej dávke na použitie (dávka pri jednej aplikácii), pričom v prípade lúhovania východiskovej chemikálie i vyzretého rezídua by sa malo vychádzať z plochy povrchu použitej pôdnej kolóny ([1]).

Referenčná chemikália

25. V pokusoch s lúhovaním by sa mala použiť referenčná chemikália (pozri bod 12). Mala by sa aplikovať na povrch pôdnej kolóny podobným spôsobom ako testovaná chemikália a v primeranom množstve, ktoré umožní dostatočnú

([1]) Množstvo, ktoré sa má aplikovať do valcových pôdnych kolón, sa môže vypočítať podľa tohto vzorca:

$$M\,[\mu g] = \frac{A\,[kg/ha] \cdot 10^9[\mu g/kg] \cdot d^2[cm^2] \cdot \pi}{10^8[cm^2/ha] \cdot 4}$$

kde:
M = množstvo použité na kolónu [µg],
A = aplikovaná dávka [kg· ha^{-1}],
d = priemer pôdnej kolóny [cm],
π = 3,14

▼M6

detekciu buď ako vnútorný štandard spolu s testovanou chemikáliou v tej istej pôdnej kolóne, alebo samostatne v osobitnej pôdnej kolóne. Vhodnejšie je, aby sa obidve chemikálie aplikovali do tej istej kolóny, okrem prípadov, keď sú obidve chemikálie podobne označené.

Pôdy

Výber pôdy

26. V štúdiách s lúhovaním východiskovej testovanej chemikálie by sa mali použiť tri až štyri pôdy s rôznym pH, obsahom organického uhlíka a textúrou (12). Usmernenie na výber pôd na pokusy s lúhovaním je uvedené ďalej v tabuľke 1. V prípade ionizovateľných testovaných chemikálií by vybraté pôdy mali pokrývať široké rozpätie pH, aby bolo možné vyhodnotiť mobilitu chemikálie v ionizovanej i neionizovanej forme. Aspoň tri pôdy by mali mať pH, pri ktorom je testovaná chemikália v mobilnej forme.

Tabuľka 1

Usmernenie na výber pôd na štúdie s lúhovaním

Č. pôdy	Hodnota pH	Organický uhlík %	Obsah ílu %	Textúra (*)
1	> 7,5	3,5 – 5,0	20 – 40	ílovitá hlina
2	5,5 – 7,0	1,5 – 3,0	15 – 25	siltová hlina
3	4,0 – 5,5	3,0 – 4,0	15 – 30	hlina
4	< 4,0 – 6,0 §	< 0,5 – 1,5 § ‡	< 10 – 15 §	hlinitý piesok
5	< 4,5	> 10 #	< 10	hlinitý piesok/piesok

(*) Podľa systémov FAO a USDA (14).

§ Príslušné premenné by podľa možnosti mali mať hodnoty v uvedenom rozsahu. Ak sa však vyskytnú ťažkosti s hľadaním vhodného pôdneho materiálu, prijateľné sú aj hodnoty nižšie ako uvedené minimum.

‡ Pôdy s menej ako 0,3 % organického uhlíka môžu narušiť koreláciu medzi obsahom organických látok a adsorpciou. Preto sa odporúča použiť pôdy s minimálnym obsahom organického uhlíka 0,3 %.

Pôdy s veľmi vysokým obsahom uhlíka (napr. > 10 %) nemusia byť prijateľné z právneho hľadiska, napr. na účely registrácie pesticídov.

27. Iné druhy pôd môžu byť niekedy potrebné na zastúpenie chladnejších, miernych a tropických oblastí. Ak sa teda uprednostňujú iné druhy pôdy, musia sa charakterizovať rovnakými parametrami a mali by mať podobné odchýlky vo vlastnostiach ako pôdy opísané v usmernení na výber pôd na štúdie s lúhovaním (pozri tabuľku 1), aj keď presne nezodpovedajú kritériám.

28. V štúdiách lúhovania s „vyzretými rezíduami“ by sa mala použiť jedna pôda (12). Mala by mať obsah piesku > 70 % a obsah organického uhlíka 0,5 až 1,5 % (napr. pôda č. 4 v tabuľke 1). Použitie viacerých druhov pôd môže byť potrebné v prípade, keď dôležitú informáciu predstavujú údaje o produktoch transformácie.

29. Všetky pôdy je potrebné charakterizovať aspoň z hľadiska textúry [% piesku, % siltu, % ílu podľa klasifikačných systémov FAO a USDA (14)], pH, kapacity výmeny katiónov, obsahu organického uhlíka, sypnej hustoty (pre narušené pôdy) a kapacity retencie vody. Meranie mikrobiálnej biomasy

▼M6

sa vyžaduje len v prípade pôdy použitej v období zretia/v inkubačnom období pred pokusom s lúhovaním vyzretých rezíduí. Informácie o ďalších vlastnostiach pôdy (napr. klasifikácii pôdy, mineralógii ílu, špecifickej povrchovej ploche) môžu byť užitočné na interpretáciu výsledkov tejto štúdie. Na určenie vlastností pôdy možno použiť metódy odporúčané v literatúre (15) (16) (17) (18) (19).

Odber a skladovanie pôd

30. Pôdy by sa mali odobrať z vrchnej vrstvy (horizontu A), ktorej hĺbka neprekračuje 20 cm. Je nutné odstrániť zvyšky vegetácie, makrofauny a kameňov. Pôdy (okrem tých, ktoré sa používajú na zretie testovanej chemikálie) sa vysušia vzduchom pri izbovej teplote (odporúča sa 20 – 25 °C). Disagregácia by sa mala vykonať s minimálnou silou, aby sa čo najmenej zmenila pôvodná textúra pôdy. Pôda sa preoseje cez sito s okami ≤ 2 mm. Odporúča sa opatrná homogenizácia, lebo sa tým zvyšuje reprodukovateľnosť výsledkov. Pred použitím možno pôdy skladovať pri teplote okolia a vysušené vzduchom (12). Neexistuje odporúčaný limit skladovania, ale pôdy, ktoré sa skladovali dlhšie než tri roky, by sa pred použitím mali znova analyzovať z hľadiska obsahu organického uhlíka a pH.

31. Mali by byť dostupné podrobné informácie o histórii lokalít, z ktorých sa testované pôdy odobrali. Údaje zahŕňajú presnú polohu [presne vymedzenú súradnicami UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) alebo zemepisnými súradnicami], vegetačnú pokrývku, aplikáciu chemikálií na ochranu plodín, aplikáciu organických a anorganických hnojív, pridanie biologických materiálov alebo náhodnú kontamináciu (12). Ak sa do pôdy v priebehu predchádzajúcich štyroch rokov aplikovala testovaná chemikália alebo jej štrukturálne analógy, nemala by sa používať na štúdie lúhovania.

Podmienky testu

32. Počas trvania testu sa pôdne kolóny na lúhovanie majú držať v tme pri teplote okolia, pokiaľ sa táto teplota udržiava v rozmedzí ± 2 °C. Odporúča sa teplota 18 až 25 °C.

33. Na povrch pôdnych kolón sa má nepretržite aplikovať umelý dážď (0,01 M $CaCl_2$) s rýchlosťou 200 mm za obdobie 48 hodín ([1]). Táto rýchlosť zodpovedá aplikácii 251 ml do kolóny s vnútorným priemerom 4 cm. Ak to je potrebné na účely testu, možno navyše použiť aj iné rýchlosti aplikácie umelého dažďa a dlhšie trvanie.

Vykonanie testu

Lúhovanie s východiskovou testovanou chemikáliou

34. Do lúhovacích stĺpcov aspoň v duplikátoch sa pridá nespracovaná, vzduchom vysušená a preosiata pôda (< 2 mm) do výšky približne 30 cm. Na to, aby bola pôda rovnomerne utlačená, sa pridáva do kolón v malých dávkach lyžicou a plunžerom sa stlačí za súčasného mierneho trasenia kolónou dovtedy, kým vrchná vrstva pôdy v kolóne neprestane klesať.

([1]) Tým sa simulujú extrémne intenzívne zrážky. Priemerný ročný úhrn zrážok napríklad v strednej Európe je rádovo 800 – 1 000 mm.

▼M6

Rovnomerné utlačenie je potrebné na získanie reprodukovateľných výsledkov v lúhovacích kolónach. Podrobnosti o metódach utláčania kolón nájdete v odkazoch (20), (21) a (22). Na kontrolu reprodukovateľnosti postupu utláčania sa stanoví celková hmotnosť pôdy utlačenej v kolónach ([1]). Hmotnosť duplikátov kolón by mala byť podobná.

35. Po utlačení sa pôdne kolóny predzvlhčia umelým dažďom (0,01 M $CaCl_2$) zdola nahor, aby sa vodou vytlačil vzduch z pórov pôdy. Potom sa pôdne kolóny nechajú dosiahnuť rovnovážny stav a nadbytočná voda odtečie pôsobením gravitácie. Metódy nasýtenia kolón sú zhrnuté v literatúre (23).

36. Následne sa do pôdnych kolón aplikuje testovaná chemikália a/alebo referenčná chemikália (pozri aj body 23 – 25). Na získanie homogénnej distribúcie by sa roztoky, suspenzie alebo emulzie testovanej a/alebo referenčnej chemikálie mali rovnomerne aplikovať na povrch pôdnych kolón. Ak sa na účely aplikácie testovanej chemikálie odporúča zapracovanie do pôdy, chemikália sa má zmiešať s malým množstvom pôdy (napr. 20 g) a pridať na povrch pôdnej kolóny.

37. Povrchy pôdnych kolón sa potom zakryjú kotúčom zo sintrového skla, sklenenými perlami, filtrami zo sklených vlákien alebo okrúhlym filtračným papierom, aby sa umelý dážď rovnomerne rozložil na celý povrch a aby sa predišlo narušeniu povrchu pôdy dažďovými kvapkami. Čím väčší je priemer kolóny, tým opatrnejšie sa do pôdnych kolón musí aplikovať umelý dážď, aby sa zabezpečilo rovnomerné rozdelenie umelého dažďa na povrchu pôdy. Potom sa umelý dážď pridáva po kvapkách do pôdnych kolón pomocou piestového alebo peristaltického čerpadla alebo prikvapkávacieho lievika. Výluhy sa podľa možnosti majú odoberať vo frakciách a majú sa zaznamenať ich príslušné objemy ([2]).

38. Po vylúhovaní a odvodnení kolón sa pôda v kolónach rozdelí na vhodný počet segmentov v závislosti od informácií, ktoré sa majú v štúdii získať. Segmenty sa extrahujú príslušnými rozpúšťadlami alebo zmesami rozpúšťadiel a analyzujú z hľadiska testovanej chemikálie a podľa potreby produktov transformácie, celkovej rádioaktivity a referenčnej chemikálie. Výluhy alebo frakcie výluhov sa analyzujú z hľadiska rovnakých produktov priamo alebo po extrakcii. Ak sa používa rádioaktívne označená testovaná chemikália, mali by sa identifikovať všetky frakcie obsahujúce ≥ 10 % aplikovanej rádioaktivity.

Lúhovanie s vyzretými rezíduami

39. Do čerstvej pôdy (vopred nevysušenej vzduchom) sa pridáva rádioaktívne označená testovaná chemikália v množstve zodpovedajúcom povrchovej ploche pôdnych kolón (pozri bod 24). Pôda sa inkubuje v aeróbnych podmienkach podľa testovacej metódy C.23 (13). Inkubačné obdobie (obdobie zretia) by malo byť dostatočne dlhé na to, aby sa vytvorilo

([1]) Príklady sypnej hustoty narušených pôd:piesčitá pôda 1,66 g · ml^{-1},
hlinitá piesčitá pôda 1,58 g · ml^{-1},
hlinitá pôda 1,17 g · ml^{-1},
siltová pôda 1,11 g · ml^{-1}.

([2]) Typický objem výluhu je v rozsahu 230 – 260 ml, čo zodpovedá približne 92 – 104 % celkového objemu aplikovaného umelého dažďa (251 ml) v prípade pôdnych kolón s priemerom 4 cm a dĺžkou 30 cm.

▼M6

významné množstvo produktov transformácie. Odporúča sa obdobie zretia zodpovedajúce jednému polčasu testovanej chemikálie ([1]), pričom toto obdobie by nemalo presiahnuť 120 dní. Pred vylúhovaním sa vyzretá pôda analyzuje z hľadiska testovanej chemikálie a produktov jej transformácie.

40. Lúhovacie kolóny sa naplnia do výšky 28 cm rovnakou pôdou (ale vysušenou vzduchom), aká sa používa v pokuse s vyzretými rezíduami opísanom v bode 34. Stanoví sa aj celková hmotnosť naplnených pôdnych kolón. Pôdne kolóny sa potom predzvlhčia podľa opisu v bode 35.

41. Testovaná chemikália a produkty jej transformácie sa následne aplikujú na povrchu pôdnych kolón vo forme vyzretých pôdnych rezíduí (pozri bod 39) ako 2 cm segment pôdy. Celková výška pôdnych kolón (neošetrená pôda + vyzretá pôda) by podľa možnosti nemala prekročiť 30 cm (pozri bod 34).

42. Lúhovanie sa vykoná podľa opisu v bode 37.

43. Po vylúhovaní sa segmenty pôdy a výluhy analyzujú z hľadiska testovanej chemikálie, produktov jej transformácie a neextrahovanej rádioaktivity podľa opisu v bode 38. Na stanovenie množstva vyzretého rezídua, ktoré po vylúhovaní zostalo vo vrchnej 2 cm vrstve, by sa tento segment mal analyzovať samostatne.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

44. Množstvá testovanej chemikálie, produktov transformácie, neextrahovateľných zložiek a referenčnej chemikálie, ak sa použije, by sa mali uvádzať v % z pôvodne aplikovanej dávky pre každý segment pôdy a frakciu výluhu. Pre každú kolónu sa má uviesť grafické znázornenie na grafe so zistenými percentami ako funkciou hĺbky pôdy.

45. Ak sa v týchto štúdiách lúhovania v kolónach použije referenčná chemikália, vylúhovanie chemikálie možno vyhodnotiť na relatívnej stupnici pomocou faktorov relatívnej mobility (RMF, vymedzenie pojmu nájdete v dodatku 3) (1) (11), ktoré umožňujú porovnať údaje o vylúhovaní rôznych chemikálií získané v rôznych druhoch pôd. Príklady hodnôt RMF pre rôzne chemikálie na ochranu plodín sú uvedené v dodatku 3.

46. Zo štúdií lúhovania v kolónach možno získať aj odhady hodnôt K_{oc} (normalizovaný adsorpčný koeficient pre organický uhlík) a K_{om} (normalizovaný distribučný koeficient pre organickú hmotu) s použitím priemernej vzdialenosti lúhovania alebo stanovenej korelácie medzi hodnotami RMF a K_{om}, resp. K_{oc} (4) alebo aplikovaním jednoduchej chromatografickej teórie (24). Posledná metóda by sa však mala používať s opatrnosťou, najmä ak vezmeme do úvahy, že proces lúhovania nezahŕňa len podmienky nasýteného prietoku, ale skôr nenasýtené systémy.

([1]) V pôde sa môže vytvoriť viacero významných produktov transformácie, ktoré sa môžu objaviť v rôznych časových bodoch štúdie transformácie. V týchto prípadoch môže byť potrebné vykonať štúdie lúhovania s vyzretými rezíduami rôzneho veku.

▼M6

Interpretácia výsledkov

47. Štúdie lúhovania v kolónach opísané v tejto metóde umožňujú stanoviť potenciál lúhovania alebo mobility testovanej chemikálie (v štúdii lúhovania východiskovej chemikálie) a/alebo produktov jej transformácie (v štúdii lúhovania vyzretých rezíduí) v pôde. Tieto testy síce kvantitatívne nepredpovedajú vyplavovanie látky zo sedimentu v terénnych podmienkach, ale môžu sa použiť na porovnanie „vylúhovateľnosti“ jednej chemikálie s inými, ktorých vlastnosti lúhovania sú známe (24). V testoch sa ani kvantitatívne nemeria percento aplikovanej chemikálie, ktorá sa môže dostať do podzemnej vody (11). Výsledky štúdií lúhovania v kolónach však môžu pomôcť pri rozhodovaní o tom, či sa má vykonať ďalšie poloterénne alebo terénne testovanie chemikálií, ktoré majú v laboratórnych testoch vysoký potenciál mobility.

Protokol o skúške

48. Protokol musí obsahovať:

Testovaná chemikália a referenčná chemikália (ak sa použije):

— bežný názov, chemický názov (názvoslovie IUPAC a CAS), číslo CAS, chemická štruktúra (s vyznačením polohy značky, ak sa používa rádioaktívne označený materiál) a relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— čistota (nečistoty) testovanej chemikálie,

— rádiochemická čistota označenej chemikálie a špecifická aktivita (v prípade potreby).

Testované pôdy:

— údaje o mieste odberu,

— vlastnosti pôdy, ako je pH, obsah organického uhlíka a ílu, textúra a sypná hustota (pre narušené pôdy),

— mikrobiálna činnosť v pôde (iba pre pôdy použité na zretie testovanej chemikálie),

— dĺžka skladovania pôdy a podmienky skladovania.

Podmienky testu:

— dátumy vykonávania štúdií,

— dĺžka a priemer lúhovacích kolón,

— celková hmotnosť pôdy v pôdnych kolónach,

— množstvo testovanej chemikálie a podľa potreby referenčnej chemikálie,

— množstvo aplikovaného umelého dažďa a frekvencia a trvanie aplikácie,

— teplota pokusnej zostavy,

— počet replikácií (aspoň dve),

— metódy na analýzu testovanej chemikálie, produktov transformácie a podľa potreby referenčnej chemikálie v rôznych segmentoch pôdy a výluhoch,

— metódy na charakterizovanie a identifikáciu produktov transformácie v segmentoch pôdy a výluhoch.

▼**M6**

Výsledky testu:

— tabuľky výsledkov vyjadrených ako koncentrácie a ako % aplikovanej dávky pre segmenty pôdy a výluhy,

— hmotnostná bilancia, ak to je vhodné,

— objemy výluhu,

— vzdialenosti lúhovania a podľa potreby faktory relatívnej mobility,

— grafické znázornenie % zisteného v segmentoch pôdy v závislosti od hĺbky segmentu pôdy,

— rozbor a interpretácia výsledkov.

LITERATÚRA

1. Guth, J.A., Burkhard, N. a 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. a 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. Príloha I k smernici Komisie 95/36/ES zo 14. júla 1995, ktorou sa mení a dopĺňa smernica Rady 91/414/EHS o umiestnení prípravkov na ochranu rastlín na trh, Ú. v. ES L 172, 22.7.1995, s. 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. januára 1995.

13. Kapitoly tejto prílohy:

Kapitola A.4, tlak pary

Kapitola A.6, rozpustnosť vo vode

▼**M6**

Kapitola A.8, rozdeľovacia konštanta, metóda trepačkovej banky

Kapitola A.24, rozdeľovacia konštanta, metóda HPLC

Kapitola C.7, degradácia — abiotická degradácia: hadrolýza ako funkcia pH

Kapitola C.18, adsorpcia/desorpcia s použitím rovnovážnej metódy dávkovania

Kapitola C.23, aeróbna a anaeróbna transformácia v pôde

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 a 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. a Schachtschabel, P. (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

20. Weber, J.B. a 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. a 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, Paríž

▼M6

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov a jednotky

Vyzreté rezíduum pôdy: testovaná chemikália a produkty transformácie prítomné v pôde po aplikácii a dostatočne dlhom období na to, aby došlo k procesom presunu, adsorpcie, metabolizmu a rozptylu, ktoré zmenia distribúciu a chemickú povahu niektorých aplikovaných chemikálií (1).

Umelý dážď: 0,01 M roztoku $CaCl_2$ v destilovanej alebo deionizovanej vode.

Priemerná vzdialenosť lúhovania: spodná časť pôdy, kde sa kumulatívne množstvo získanej chemikálie = 50 % z celkového množstva získanej chemikálie (pokus s bežným vylúhovaním), alebo hodnote vypočítanej podľa vzorca (spodná časť pôdy, kde sa kumulatívne množstvo získanej chemikálie = 50 % z celkového množstva získanej chemikálie) – [(hrúbka vrstvy vyzretého rezídua)/2] (štúdia lúhovania vyzretého rezídua).

Chemikália: látka alebo zmes.

Výluh: vodná fáza vylúhovaná cez pôdny profil alebo pôdnu kolónu (1).

Lúhovanie: proces, prostredníctvom ktorého sa chemikália pohybuje smerom nadol cez pôdny profil alebo pôdnu kolónu (1).

Vzdialenosť lúhovania: najhlbší segment pôdy, v ktorom sa po procese lúhovania našlo ≥ 0,5 % aplikovanej testovanej chemikálie alebo vyzretého rezídua (ekvivalent hĺbky prieniku).

Detekčný limit (LOD) a **kvantifikačný limit (LOQ)**: detekčný limit (LOD) je koncentrácia chemikálie, pod ktorou nemožno chemikáliu odlíšiť od analytických artefaktov. Kvantifikačný limit (LOQ) je koncentrácia chemikálie, pod ktorou nemožno stanoviť koncentráciu s prípustnou presnosťou.

RMF – faktor relatívnej mobility: [vzdialenosť lúhovania testovanej chemikálie (cm)]/[vzdialenosť lúhovania referenčnej chemikálie (cm)].

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Produkt transformácie: všetky chemikálie, ktoré sú výsledkom biotických alebo abiotických transformačných reakcií testovanej chemikálie vrátane CO_2 a produktov viazaných v rezíduách.

Pôda: zmes anorganických a organických chemických zložiek. Medzi organické zložky patria zlúčeniny s vysokým obsahom uhlíka a dusíka a vysokou molekulovou hmotnosťou. V pôde žijú malé (väčšinou mikroskopické) organizmy. S pôdou možno manipulovať v dvoch stavoch:

— nenarušenom, teda v stave, ktorý vznikol pôsobením času vytvorením charakteristických vrstiev rôznych druhov pôdy,

— narušenom, aký sa väčšinou nachádza v ornej pôde alebo aký vzniká, keď sa vzorky odobrali výkopom a použili v tejto testovacej metóde (2).

1. Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167 – 1193.

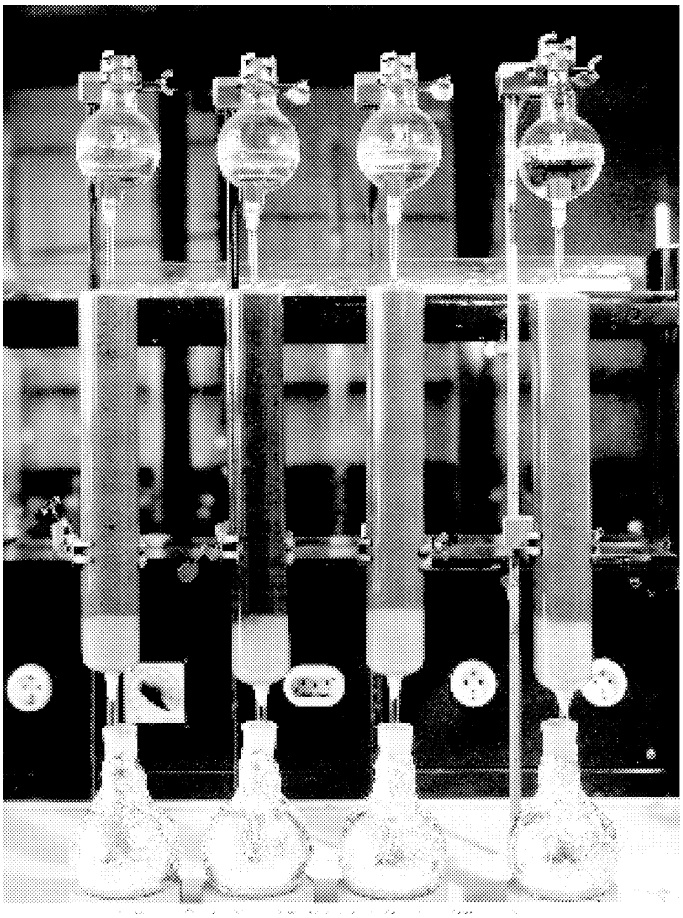
2. OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (prijaté 12. mája 1981).

▼**M6**

Dodatok 2

Obrázok 1

Príklad nerozdeliteľných lúhovacích kolón vyrobených zo skla s dĺžkou 35 cm a vnútorným priemerom 5 cm (1)



← Prikvapkávacie lieviky na aplikovanie umelého dažďa

← Kotúč zo sintrového skla na zabránenie narušeniu povrchu pôdy a na rovnomernú distribúciu umelého dažďa

← Sklenená kolóna naplnená testovanou pôdou (pri testovaní produktov citlivých na svetlo sa kolóny majú obaliť hliníkovou fóliou)

← Vrstva kremenného piesku

← Zátka zo sklenej vaty na udržanie pôdy v kolóne

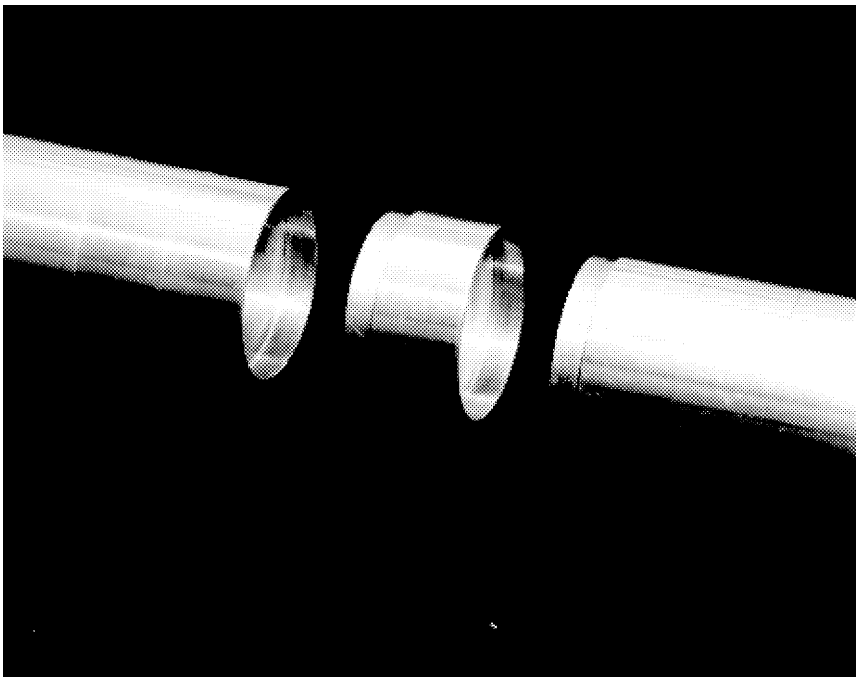
← Kadička s guľatým spodkom na zber výluhu zabalená v hliníkovej fólii na zabránenie fotolýze

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**

Obrázok 2

Príklad rozdeliteľnej kovovej kolóny s vnútorným priemerom 4 cm (1)



1. Burkhard, N., Eberle D.O. a Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203 – 213.

▼M6

Dodatok 3

Príklady faktorov relatívnej mobility (*) (RMF) pre rôzne chemikálie na ochranu plodín (1) (2) a zodpovedajúce triedy mobility (+)

Rozsah RMF	Chemikália (RMF)	Trieda mobility
≤ 0,15	Paratión (< 0,15), fluórdifén (0,15)	Inemobilné
0,15 – 0,8	Profenofos (0,18), propikonazol (0,23), diazinón (0,28), diurón (0,38), terbutylazín (0,52), metidatión (0,56), prometrín (0,59), propazín (0,64), alachlór (0,66), metolachlór (0,68)	II mierne mobilné
0,8 – 1,3	Monurón (**) (1,00), atrazín (1,03), simazín (1,04), fluometurón (1,18)	III stredne mobilné
1,3 – 2,5	Prometón (1,67), kyánazín (1,85), brómacil (1,91), karbutilát (1,98)	IV dosť mobilné
2,5 – 5,0	Karbofurán (3,00), dioxakarb (4,33)	V mobilné
> 5,0	Monokrotofos (> 5,0), dikrotofos (> 5,0)	VI veľmi mobilné

(*) Faktor relatívnej mobility sa odvodzuje takto (3):

$$\text{RMF} = \frac{\text{vzdialenosť lúhovania testovanej chemikálie(cm)}}{\text{vzdialenosť lúhovania referenčnej chemikálie(cm)}}$$

(**) Referenčná chemikália

\+ Iné systémy klasifikácie mobility chemikálie v pôde sú založené na hodnotách R_f získaných chromatografiou na tenkej vrstve pôdy \big(4) a na hodnotách K_{oc} (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. júla 1985.

2. Guth, J.A. a 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. a 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. ODHAD EMISIÍ Z DREVA OŠETRENÉHO OCHRANNÝM PROSTRIEDKOM DO ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA: LABORATÓRNA METÓDA PRE DREVENÉ KOMODITY BEZ POVRCHOVEJ ÚPRAVY, KTORÉ SÚ V KONTAKTE SO SLADKOU VODOU ALEBO MORSKOU VODOU

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 313 (2007). Emisie z dreva ošetreného ochranným prostriedkom do životného prostredia je potrebné kvantifikovať, aby bolo možné posúdiť riziko ošetreného dreva pre životné prostredie. Táto testovacia metóda opisuje laboratórnu metódu na stanovenie emisií z dreva ošetreného ochranným prostriedkom v dvoch situáciách, v ktorých sa emisie môžu dostať do životného prostredia:

   — Emisie z ošetreného dreva v kontakte so sladkou vodou. Emisie z povrchu ošetreného dreva sa môžu dostať do vody.

   — Emisie z ošetreného dreva v kontakte s morskou vodou. Emisie z povrchu ošetreného dreva sa môžu dostať do morskej vody.

2. Táto testovacia metóda je určená na testovanie emisií z dreva a drevených komodít bez povrchovej úpravy, ktoré sú v kontakte so sladkou vodou alebo morskou vodou. Triedy použitia sa používajú na medzinárodnej úrovni na kategorizáciu biologického nebezpečenstva, ktoré spôsobuje ošetrená komodita. Triedy použitia slúžia aj na vymedzenie situácie, v ktorej sa používa ošetrená komodita, a na stanovenie zložiek životného prostredia (ovzdušie, voda, pôda), ktoré sú potenciálne ohrozené drevom ošetreným ochranným prostriedkom.

3. Testovacia metóda je laboratórny postup získavania vzoriek (emisátu) z vody použitej na ponorenie ošetreného dreva vo zvyšujúcich sa časových intervaloch po expozícii. Množstvo emisií v emisáte sa dá do súvislosti s plochou povrchu dreva a dĺžkou expozície, pomocou ktorých sa odhadne tok v mg/m^2/deň. Možno tak odhadnúť tok (rýchlosť lúhovania) po predĺžení intervalov expozície.

4. Množstvo emisií sa môže použiť na posúdenie rizika ošetreného dreva pre životné prostredie.

ÚVODNÉ ÚVAHY

5. Mechanizmus lúhovania sladkou vodou na povrchu dreva sa nepovažuje za identický s lúhovaním z povrchu dreva morskou vodou, pokiaľ ide o jeho povahu a závažnosť. V prípade produktov alebo zmesí na ochranu dreva slúžiacich na ošetrenie dreva používaného v morskom prostredí je preto nutné vykonať štúdiu lúhovania z dreva pre morskú vodu.

6. Drevo ošetrené ochranným prostriedkom na drevo by malo predstavovať komerčne používané drevo. Malo by sa s ním zaobchádzať v súlade s pokynmi výrobcu ochranného prostriedku a s príslušnými normami a špecifikáciami. Je nutné uviesť parametre úpravy dreva po ošetrení pred začatím testu.

7. Použité vzorky dreva by mali predstavovať používané komodity (napr. pokiaľ ide o druh, hustotu a iné vlastnosti).

▼M6

8. Test možno použiť na drevo s využitím procesu prieniku alebo povrchovej aplikácie alebo na ošetrené drevo, ktoré obsahuje doplnkovú povinnú povrchovú úpravu (napr. aplikovanú farbu ako požiadavku na komerčné použitie).

9. Na stanovenie množstva, obsahu a povahy emisií z dreva je nutné poznať zloženie, množstvo, pH a fyzikálnu formu vody.

PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

10. Skúšobné vzorky dreva ošetrené ochranným prostriedkom sa ponoria do vody. Voda (emisát) sa odoberie a chemicky analyzuje počas expozičného obdobia toľkokrát, aby to stačilo na štatistické výpočty. Z analytických výsledkov sa vypočítajú rýchlosti emisie v mg/m^2/deň. Je potrebné zaznamenať časy odberu vzoriek. Testy s neošetrenými vzorkami možno zastaviť, ak sa nezistí žiadne pozadie v prvých troch bodoch zberu údajov.

11. Zahrnutie vzoriek neošetreného dreva umožňuje stanoviť úrovne emisátov z dreva v pozadí iných, ako je použitý ochranný prostriedok.

KRITÉRIÁ KVALITY

Správnosť

12. Správnosť testovacej metódy, pokiaľ ide o odhad emisií, závisí od toho, či testované vzorky predstavujú komerčne ošetrené drevo, do akej miery voda zodpovedá skutočnej vode a do akej miery režim expozície zodpovedá prírodným podmienkam.

13. Správnosť, presnosť a opakovateľnosť analytickej metódy by sa mali stanoviť pred vykonaním testu.

Reprodukovateľnosť

14. Odoberú a analyzujú sa tri vzorky vody, pričom ako hodnota emisií sa použije priemerná hodnota. Reprodukovateľnosť výsledkov v rámci jedného laboratória a medzi rôznymi laboratóriami závisí od režimu ponárania a dreva použitého ako skúšobná vzorka.

Prijateľný rozsah výsledkov

15. Prijateľný rozsah výsledkov tohto testu je taký, kde sa horné a spodné hodnoty líšia o menej ako jednu rádovú hodnotu.

PODMIENKY TESTU

Voda

16. Scenáre lúhovania sladkou vodou: Keď sa má v teste lúhovania vyhodnotiť drevo vystavené sladkej vode, odporúča sa použiť deionizovanú vodu (napr. ASTM D 1193 typ II). Teplota vody má byť 20 °C ± 2 °C. Do protokolu o skúške je potrebné uviesť nameranú hodnotu pH a teplotu vody. Analýza vzoriek použitej vody odobratých pred ponorením ošetrených vzoriek umožňuje odhadnúť analyzované chemikálie vo vode. Používa sa ako kontrola na určenie úrovní chemikálií, ktoré sa potom chemicky analyzujú, v pozadí.

▼M6

17. Scenáre lúhovania morskou vodou: Keď sa má v teste lúhovania vyhodnotiť drevo vystavené morskej vode, odporúča sa použiť umelú morskú vodu (napr. ASTM D 1141, náhradná oceánska voda bez ťažkých kovov). Teplota vody má byť 20 °C ± 2 °C. Do protokolu o skúške je potrebné uviesť nameranú hodnotu pH a teplotu vody. Analýza vzoriek použitej vody odobratých pred ponorením ošetrených vzoriek umožňuje odhadnúť analyzované chemikálie vo vode. Používa sa ako kontrola na analýzu úrovní dôležitých chemikálií v pozadí.

Skúšobné vzorky dreva

18. Druh dreva by mal byť typickým druhom dreva používaným na testovanie účinnosti ochranných prostriedkov na drevo. Odporúčané druhy sú *Pinus sylvestris L.* (borovica lesná), *Pinus resinosa Ait*. (borovica smolná) alebo *Pinus spp.* (rod borovica). Môžu sa urobiť aj doplnkové testy s použitím iných druhov.

19. Malo by sa použiť rovné vláknité drevo bez uzlov. Materiál živicového vzhľadu by sa nemal používať. Drevo musí byť typickým komerčne dostupným drevom. Treba zaznamenať zdroj, hustotu a počet letokruhov na 10 mm.

20. Odporúča sa, aby skúšobné vzorky dreva boli súbory piatich blokov s veľkosťou podľa normy EN 113 (rozmery 25 mm × 50 mm × 15 mm) s pozdĺžnymi plochami rovnobežnými s vláknom dreva. Možno však použiť aj iné rozmery, napríklad 50 mm x 150 mm x10 mm. Skúšobná vzorka sa má úplne ponoriť do vody. Skúšobné vzorky sa musia 100 % skladať z beľového dreva. Každá vzorka sa jedinečne označí, aby ju počas testu bolo možné identifikovať.

21. Všetky skúšobné vzorky by mali mať rovný povrch alebo by sa mali narezať tak, aby mali rovný povrch, a povrchy by sa nemali šmirgľovať.

22. Počet súborov testovaných vzoriek dreva použitých na analýzu je aspoň päť: tri súbory vzoriek sa ošetria ochranným prostriedkom, jeden súbor vzoriek sa neošetrí a jeden súbor vzoriek sa použije na odhadnutie obsahu vlhkosti skúšobných vzoriek vysušených v peci pred ošetrením. Pripraví sa dostatočné množstvo skúšobných vzoriek, aby bolo možné vybrať tri súbory vzoriek, ktoré sú v rozmedzí 5 % priemernej hodnoty retencie ochranného prostriedku v skupine skúšobných vzoriek.

23. Všetky skúšobné vzorky sa na konci utesnia chemikáliou, ktorá zabraňuje prieniku ochranného prostriedku do koncového vlákna vzoriek alebo lúhovaniu zo vzorky cez koncové vlákno. Pri aplikovaní koncovej tesniacej látky je potrebné rozlišovať medzi vzorkami použitými na povrchovú aplikáciu a na procesy prieniku. Koncová tesniaca látka sa musí aplikovať pred ošetrením iba v prípade povrchovej aplikácie.

24. V prípade procesov prieniku musí byť koncové vlákno otvorené, aby bolo možné drevo ošetriť. Vzorky sa teda musia na konci utesniť až na konci obdobia úpravy. Emisie sa odhadujú len pre pozdĺžne povrchové plochy. Tesniace látky sa pred začiatkom lúhovania musia skontrolovať a podľa potreby aplikovať znova. Po začiatku lúhovania by sa už nemali aplikovať.

▼M6

Ponorná nádoba

25. Nádoba je vyrobená z inertného materiálu a je dostatočne veľká na to, aby sa do nej zmestilo päť vzoriek dreva podľa normy EN 113 v 500 ml vody, teda s pomerom povrchovej plochy k objemu vody 0,4 cm^2/ml.

Zostava na testovanie vzoriek

26. Skúšobné vzorky sú pripevnené na zostave, ktorá umožňuje kontakt všetkých vystavených povrchov vzorky s vodou.

POSTUP OŠETRENIA OCHRANNÝM PROSTRIEDKOM

Príprava ošetrených skúšobných vzoriek

27. Skúšobná vzorka dreva, ktorá sa má v teste ošetriť ochranným prostriedkom, sa ošetrí metódou uvedenou pre daný ochranný prostriedok. Môže to byť proces ošetrenia prienikom alebo proces povrchovej aplikácie, a to ponorením, postriekaním alebo nanesením kefou.

Ochranné prostriedky, ktoré sa majú aplikovať procesom ošetrenia prienikom

28. Pripraví sa taký roztok ochranného prostriedku, pomocou ktorého sa dosiahne špecifikovaná absorpcia alebo retencia pri použití procesu ošetrenia prienikom. Skúšobná vzorka dreva sa odváži a odmerajú sa jej rozmery. Proces ošetrenia prienikom by mal byť v súlade so špecifikáciou pre aplikovanie ochrannej látky na drevo používanou v rámci triedy použitia 4 alebo 5. Vzorka sa po ošetrení znova odváži a vypočíta sa retencia ochranného prostriedku (kg/m^3) z rovnice:

$$\frac{\text{hmotnosť po ošetrení(kg)} - \text{hmotnosť pred ošetrením(kg)}}{\text{objem skúšobnej vzorky}(m^3)} \times \frac{\text{koncentrácia roztoku(hmotnostné\%/hmotnostné)}}{100}$$

29. V tomto teste možno použiť aj drevo ošetrené v zariadení na priemyselné ošetrenie \big(napr. vákuovo-tlakovou impregnáciou). Použité postupy by sa mali zaznamenať a musí sa analyzovať a zaznamenať retencia materiálu ošetreného týmto spôsobom.

Ochranné prostriedky, ktoré sa majú aplikovať procesmi povrchovej aplikácie

30. Proces povrchovej aplikácie zahŕňa ponáranie alebo postrekovanie skúšobných vzoriek dreva alebo nanášanie ochranného prostriedku kefou. Proces a miera aplikácie (napr. litre/m^2) by mali byť v súlade so špecifikáciou pre povrchovú aplikáciu ochranného prostriedku.

31. Aj v tomto prípade možno v tomto teste použiť drevo ošetrené v zariadení na priemyselné ošetrenie. Použité postupy by sa mali zaznamenať a musí sa analyzovať a zaznamenať retencia materiálu ošetreného týmto spôsobom.

Úprava skúšobných vzoriek po ošetrení

32. Po ošetrení sa ošetrené skúšobné vzorky majú upraviť v súlade s odporúčaniami dodávateľa testovaného ochranného prostriedku podľa požiadaviek na označení prostriedku alebo v súlade s postupmi komerčného ošetrenia alebo normou EN 252.

▼M6

Príprava a výber skúšobných vzoriek

33. Po úprave po ošetrení sa vypočíta priemerná retencia skupiny testovaných vzoriek a na meranie lúhovania sa náhodne vyberú tri reprezentatívne súbory vzoriek s retenciou v rozmedzí 5 % priemeru pre skupinu.

POSTUP MERANÍ EMISIÍ OCHRANNÉHO PROSTRIEDKU

Metóda ponorenia

34. Skúšobné vzorky sa odvážia a následne úplne ponoria do vody, pričom sa zaznamená dátum a čas. Nádoba sa zakryje, aby sa znížilo odparovanie.

35. Voda sa vymieňa v týchto časových bodoch: 6 hodín, 1 deň, 2 dni, 4 dni, 8 dní, 15 dní, 22 dní, 29 dní (poznámka: sú to celkové časy, nie intervaly). Je potrebné zaznamenať čas a dátum výmeny vody a hmotnosť vody odobratej z nádoby.

36. Po každej výmene vody sa odloží vzorka vody, do ktorej bol ponorený súbor skúšobných vzoriek, na následnú chemickú analýzu.

37. Postup odberu vzoriek umožňuje výpočet profilu množstva emisií v čase. Vzorky by sa mali skladovať za podmienok, ktoré chránia analyt, napr. v chladničke a v tme, aby sa znížil rast mikróbov vo vzorke pred analýzou.

MERANIA EMISIÍ

Ošetrené vzorky

38. Odobratá voda sa podľa potreby chemicky analyzuje z hľadiska účinnej látky a/alebo relevantných produktov degradácie/transformácie.

Neošetrené vzorky

39. Odber vody (emisátu) v tomto systéme a následná analýza chemikálií, ktoré sa vylúhovali zo vzoriek neošetreného dreva, umožňujú odhadnúť možnú rýchlosť emisie ochranného prostriedku z neošetreného dreva. Odber a analýza emisátu po predĺžení časových intervalov expozície umožňujú odhadnúť mieru zmeny rýchlosti emisie v čase. Táto analýza je kontrolným postupom na určenie úrovne testovanej chemikálie v pozadí v neošetrenom dreve, ktorého účelom je potvrdiť, že drevo použité ako zdroj vzoriek nebolo predtým ošetrené ochranným prostriedkom.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Chemické analýzy

40. Odobratá voda sa chemicky analyzuje a výsledok analýzy vody sa vyjadrí vo vhodných jednotkách, napr. µg/l.

Hlásenie údajov

41. Všetky výsledky sa zaznamenajú. Dodatok obsahuje príklad navrhovaného formulára na záznam údajov o jednom súbore ošetrených skúšobných vzoriek, ako aj súhrnnú tabuľku na výpočet priemerných hodnôt emisií v každom intervale odberu vzoriek.

42. Denný tok emisií v mg/m^2/deň sa vypočíta ako priemer troch meraní z troch replikátov vydelený počtom dní ponorenia.

▼M6

Protokol o skúške

43. Protokol o skúške má obsahovať aspoň tieto informácie:

— názov dodávateľa testovaného ochranného prostriedku,

— osobitný a jedinečný názov alebo kód testovaného ochranného prostriedku,

— obchodný alebo bežný názov účinnej zložky (účinných zložiek) so všeobecným opisom ďalších zložiek (napr. pomocného rozpúšťadla, živice) a zloženie v hmotnostných % zložiek,

— príslušná retencia alebo zaťaženie (v kg/m^3, resp. l/m^2) špecifikované pre použité drevo pri kontakte s vodou,

— druh použitého dreva a jeho hustota a rýchlosť rastu v letokruhoch na 10 mm,

— zaťaženie alebo retencia testovaného ochranného prostriedku a vzorec použitý na výpočet retencie, vyjadrené v l/m^2 alebo kg/m^3,

— metóda aplikácie ochranného prostriedku s uvedením harmonogramu ošetrovania použitého v procese prieniku a metóda aplikácie v prípade povrchového ošetrenia,

— dátum aplikácie ochranného prostriedku a odhad obsahu vlhkosti skúšobných vzoriek vyjadrený ako percento,

— použité postupy úpravy s uvedením typu, podmienok a trvania,

— špecifikácia koncovej tesniacej látky a počet aplikovaní,

— špecifikácia prípadného následného ošetrenia dreva, napr. špecifikácia dodávateľa, typu, vlastností a množstva náteru,

— čas a dátum každého ponorenia, množstvo vody použitej na ponorenie skúšobných vzoriek pri každom ponorení a množstvo vody absorbovanej drevom pri ponorení,

— akákoľvek odchýlka od opísanej metódy a všetky faktory, ktoré mohli mať vplyv na výsledky.

LITERATÚRA

1. Európska norma, EN 84 – 1997. Ochranné prostriedky na drevo. Urýchlené starnutie ošetreného dreva na biologické skúšky. Postup vyplavovaním.

2. Európska norma, EN 113/A1 – 2004. Ochranné prostriedky na drevo. Skúšobná metóda zisťovania ochrannej účinnosti proti drevokazným hubám *Basidiomycetes*. Zisťovanie hraníc účinnosti.

3. Európska norma, EN 252 – 1989. Postup skúšok na zisťovanie relatívnej účinnosti ochranného prostriedku na drevo v kontakte so zemou v prírodných podmienkach.

4. Európska norma, EN 335 – Part 1: 2006. Trvanlivosť dreva a výrobkov na báze dreva. Triedy používania: definície, časť 1: Všeobecné.

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

Dodatok 1

Formulár na záznam údajov z testovacej metódy

Odhad emisií z dreva ošetreného ochranným prostriedkom do životného prostredia: laboratórna metóda pre drevené komodity bez povrchovej úpravy, ktorésú v kontakte so sladkou vodou alebo morskou vodou

Testujúca inštitúcia	

Prostriedok na ochranu dreva

Dodávateľ ochranného prostriedku	
Osobitný a jedinečný názov alebo kód ochranného prostriedku	
Obchodný alebo bežný názov ochranného prostriedku	
Ďalšie zložky	
Príslušná retencia použitého dreva pri kontakte s vodou	

Aplikácia

Metóda aplikácie	
Dátum aplikácie	
Vzorec použitý na výpočet retencie:	
Postup úpravy	
Trvanie úpravy	
Koncová tesniaca látka/počet aplikovaní	
Následné ošetrenie	ak sa použije

Skúšobné vzorky

Druh dreva	
Hustota dreva	(minimum … priemerná hodnota … maximum)
Rýchlosť rastu (letokruhy na 10 mm)	(minimum … priemerná hodnota … maximum)
Obsah vlhkosti	

▼M6

Testovacie zostavy (*)	**Retencia (napr. kg/m^3)**
Ošetrené „x“	Priemerná hodnota a štandardná odchýlka alebo rozsah pre päť vzoriek
Ošetrené „y“	Priemerná hodnota a štandardná odchýlka alebo rozsah pre päť vzoriek
Ošetrené „z“	Priemerná hodnota a štandardná odchýlka alebo rozsah pre päť vzoriek
Neošetrené	
Odchýlka od parametrov testovacej metódy	napr. kvalita vody, rozmery testovaných vzoriek atď.

(*) x, y, z predstavujú tri replikáty vzorky

▼M6

Čas	Výmena vody	Hmotnosť vzorky		Absorpcia vody		Vzorka vody				
		Ošetrené (priemer)	Neošetrené	Ošetrené (priemer)	Neošetrené		Voda použitá na testovanie	x	y	z
	Dátum	g	g	g	g	č.	pH	pH	pH	pH
začiatok										
6 hod.						1				
24 hod.						2				
2 dni						3				
4 dni						4				
8 dní						5				
15 dní						6				
22 dní						7				
29 dní						8				

▼M6

Pre každú účinnú zložku vytvorte samostatnú tabuľku.

Čas	Výmena vody	Výsledky analýzy															
		Neošetrené vzorky			Ošetrené vzorky												
		Koncentrácia úč. látky vo vode mg/l	Množstvo emisií mg/m2	Rýchlosť emisie mg/m2/d	Koncentrácia úč. látky vo vode				Množstvo emisií				Rýchlosť emisie			
					x	y	z	Priemer	x	y	z	Priemer	x	y	z	Priemer
	Dátum				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m2	mg/m2	mg/m2	mg/m2	mg/m2/d	mg/m2/d	mg/m2/d	mg/m2/d
6 hod.																
24 hod.																
2 dni																
4 dni																
8 dní																
15 dní																
22 dní																
29 dní																

Poznámka: Keďže na korekciu rýchlostí emisie z ošetrených vzoriek môže byť nutné použiť výsledky pre neošetrené vzorky, výsledky pre neošetrené vzorky by mali byť k dispozícii ako prvé a všetky hodnoty pre ošetrené vzorky budú „opravené hodnoty“. Môže sa vykonať aj korekcia počiatočnej analýzy vody.

▼**M6**

Dodatok 2

Vymedzenie pojmov

Chemikália: látka alebo zmes.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

▼M6

C.46. BIOAKUMULÁCIA PRI BENTICKÝCH MÁLOŠTETINAVCOCH ŽIJÚCICH V SEDIMENTE

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 2008. Endobentické živočíchy živiace sa sedimentom môžu byť vystavené látkam viazaným na sediment (1). Medzi týmito živočíchmi živiacimi sa sedimentom zohrávajú vodné máloštetinavce významnú úlohu na dnách vodných systémov. Žijú v sedimente a často sú najrozšírenejšími druhmi najmä na biotopoch s podmienkami životného prostredia, ktoré sú pre iné živočíchy nepriaznivé. Tieto živočíchy vzhľadom na bioturbáciu sedimentu a skutočnosť, že bývajú častou korisťou, môžu významne ovplyvňovať biodostupnosť týchto látok pre iné organizmy, napr. bentivorné ryby. Na rozdiel od epibentických organizmov sa endobentické vodné máloštetinavce zahrabávajú do sedimentu a živia sa časticami sedimentu pod jeho povrchom. Z tohto dôvodu sú tieto organizmy vystavené látkam prostredníctvom mnohých spôsobov absorpcie vrátane priameho kontaktu, požierania kontaminovaných častíc sedimentu, vody nachádzajúcej sa v póroch sedimentu a nadložnej vody. Niektoré druhy bentických máloštetinavcov, ktoré sa v súčasnosti využívajú v ekotoxikologickom testovaní, sú opísané v dodatku 6.

2. Medzi parametre, ktoré charakterizujú bioakumuláciu látky, patrí predovšetkým bioakumulačný faktor (BAF), konštanta vyjadrujúca rýchlosť sorpcie látok sedimentu (ks) a konštanta rýchlosti eliminácie (ke). Podrobné vymedzenie týchto parametrov je uvedené v dodatku 1.

3. Na vyhodnotenie bioakumulačného potenciálu látok vo všeobecnosti a na skúmanie bioakumulácie látok, ktoré majú tendenciu rozdeľovať sa do sedimentov a na ne, je potrebná testovacia metóda špecifická pre daný kompartment (1) (2) (3) (4).

4. Táto testovacia metóda je určená na hodnotenie bioakumulácie látok viazaných na sediment pri endobentických červoch máloštetinavcoch. Testovaná látka sa aplikuje do sedimentu. Použitím obohateného sedimentu sa simuluje kontaminovaný sediment.

5. Táto metóda je založená na existujúcich testovacích metódach stanovenia toxicity a bioakumulácie v sedimente (1) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Ďalšie užitočné dokumenty: diskusie a výsledky z medzinárodného seminára (11) a výsledok medzinárodného kruhového testu (12).

6. Táto skúška sa týka stabilných neutrálnych organických látok, ktoré majú tendenciu viazať sa na sediment. Pomocou tejto metódy možno merať aj bioakumuláciu stabilných organokovových zlúčenín, ktoré sa viažu na sediment (12). Nemožno ju použiť na kovy a iné stopové prvky (11) bez úpravy koncepcie testu s ohľadom na substrát a objemy vody a prípadne na veľkosť vzorky tkaniva.

PREDPOKLADY A INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

7. V súčasnosti existuje iba niekoľko dobre stanovených kvantitatívnych vzťahov štruktúry a aktivity (QSAR) v súvislosti s procesmi bioakumulácie (14). Najpoužívanejším vzťahom je korelácia medzi bioakumuláciou a biokoncentráciou stabilných organických látok a ich lipofilitou [vyjadrená ako logaritmus rozdeľovacej konštanty oktanol – voda (log K_{ow}), vymedzenie pojmu nájdete v dodatku 1], ktorá sa používa na opis rozdeľovania látky medzi vodu a ryby. Pomocou tohto vzťahu sa stanovili aj korelácie pre

▼M6

kompartment sedimentu (15) (16) (17) (18). Korelácia medzi hodnotami log K_{ow} a log BCF (logaritmus faktora biokoncentrácie) ako hlavný ukazovateľ QSAR môže byť užitočná na prvý predbežný odhad bioakumulačného potenciálu látok viazaných na sediment. Hodnota BAF však môže byť ovplyvnená obsahom lipidov v testovacom organizme a obsahom organického uhlíka v sedimente. Preto možno ako hlavný faktor bioakumulácie organických látok viazaných na sediment použiť aj rozdeľovaciu konštantu organický uhlík – voda (K_{oc}).

8. Tento test sa uplatňuje na:

— stabilné organické látky s hodnotami log K_{ow} medzi 3,0 a 6,0 (5) (19) a superlipofilné látky s hodnotou log K_{ow} vyššou ako 6,0 (5),

— látky patriace do triedy organických látok známych svojím bioakumulačným potenciálom v živých organizmoch, napr. povrchovo aktívne látky alebo vysoko adsorpčné látky (napr. vysoká hodnota K_{oc}).

9. Pred začiatkom štúdie je potrebné získať informácie o testovanej látke, napríklad o bezpečnostných preventívnych opatreniach, vhodných podmienkach skladovania a stabilite, ako aj o analytických metódach. Usmernenia na testovanie látok s fyzikálno-chemickými vlastnosťami, ktoré sťažujú ich testovanie, sú uvedené v odkazoch (20) a (21). Pred vykonaním testu bioakumulácie s vodnými máloštetinavcami musia byť známe tieto informácie o testovanej látke:

— bežný názov, chemický názov (podľa možnosti názov IUPAC), štruktúrny vzorec, registračné číslo CAS, čistota,

— rozpustnosť vo vode [testovacia metóda A.6 (22)],

— rozdeľovacia konštanta oktanol – voda, K_{ow} [testovacie metódy A.8, A.24 (22)],

— rozdeľovacia konštanta sediment – voda vyjadrený ako K_d alebo K_{oc} [testovacia metóda C.19 (22)],

— hydrolýza [testovacia metóda C.7 (22)],

— fototransformácia vo vode (23),

— tlak pary [testovacia metóda A.4 (22)],

— ľahká biodegradovateľnosť [testovacie metódy C.4 a C.29 (22)],

— povrchové napätie [testovacia metóda A.5 (22)],

— kritická koncentrácia micel (24).

Okrem toho sú dôležité aj tieto informácie – ak sú dostupné:

— biodegradácia vo vodnom prostredí [testovacie metódy C.24 a C.25 (22)],

— Henryho konštanta.

10. Rádioaktívne označené testované látky môžu uľahčiť analýzu vzoriek vody, sedimentu a biologických vzoriek a môžu sa použiť na stanovenie toho, či sa má vykonať identifikácia a kvantifikácia produktov degradácie. Metóda, ktorá je tu opísaná, bola validovaná v medzinárodnom kruhovom teste (12) pre látky označené uhlíkom ^{14}C. Ak sa merajú celkové rádioaktívne rezíduá, bioakumulačný faktor (BAF) je založený na východiskovej látke

▼M6

vrátane všetkých zachovaných produktov degradácie. Takisto je možné skombinovať štúdiu metabolizmu so štúdiou bioakumulácie prostredníctvom analýzy a kvantifikácie percenta východiskovej látky a produktov jej degradácie vo vzorkách odobratých na konci vychytávacej fázy alebo na vrcholovej úrovni bioakumulácie. V každom prípade sa odporúča, aby výpočet hodnoty BAF vychádzal z koncentrácie východiskovej látky v organizmoch, nielen z celkových rádioaktívnych rezíduí.

11. Okrem vlastností testovanej látky medzi ďalšie požadované informácie patrí toxicita pre druhy máloštetinavcov použité v teste, napríklad stredná letálna koncentrácia (LC_{50}) v čase potrebnom na vychytávaciu fázu, aby sa zabezpečilo, že zvolené koncentrácie expozície sú oveľa nižšie ako toxické úrovne. Prednostne by sa mali použiť hodnoty toxicity získané z dlhodobých štúdií o subletálnych sledovaných parametroch (EC_{50}), ak sú k dispozícii. Ak také údaje nie sú dostupné, užitočné informácie môže poskytnúť test akútnej toxicity za podmienok, ktoré sú identické s podmienkami testovania bioakumulácie, alebo údaje o toxicite pre iné náhradné druhy.

12. Musí byť k dispozícii vhodná analytická metóda známej správnosti, presnosti a citlivosti na kvantifikáciu látky v testovacích roztokoch, sedimente a biologickom materiáli, ako aj údaje o príprave a skladovaní vzoriek a karty bezpečnostných údajov o materiáli. Treba poznať aj analytické detekčné limity testovanej látky vo vode, v sedimente a v tkanivách červov. Ak sa použije rádioaktívne označená testovaná látka, je nutné poznať aj špecifickú rádioaktivitu (t. j. Bq mol^{-1}), polohu rádioaktívne označeného atómu a percento rádioaktivity spojenej s nečistotami. Špecifická rádioaktivita testovanej látky by mala byť čo najvyššia, aby bolo možné zistiť čo najnižšie testované koncentrácie (11).

13. Mali by byť k dispozícii informácie o charakteristikách použitého sedimentu [napr. pôvod sedimentu alebo jeho zložiek, pH a koncentrácia amoniaku vo vode nachádzajúcej sa v póroch sedimentu (terénne sedimenty), obsah organického uhlíka (TOC), rozdelenie veľkosti častíc (percento piesku, siltu a ílu) a percento suchej hmotnosti] (6).

PRINCÍP TESTU

14. Test sa skladá z dvoch fáz: vychytávacej fázy (expozícia) a fázy eliminácie (po expozícii). Počas vychytávacej fázy sa červy vystavia pôsobeniu sedimentu obohateného testovanou látkou s rekonštituovanou vodou navrchu, podľa potreby po dosiahnutí rovnovážneho stavu (11). Skupiny kontrolných červov sa chovajú v tých istých podmienkach bez testovanej látky.

15. Vo fáze eliminácie sa červy prenesú do systému sediment – voda, ktorý neobsahuje testovanú látku. Fáza eliminácie je nutná na získanie informácií o rýchlosti, ktorou testovacie organizmy vylučujú testovanú látku (19) (25). Fáza eliminácie je nutná vždy okrem prípadu, keď je absorpcia testovanej látky počas fázy expozície bezvýznamná (napr. neexistuje štatistický rozdiel medzi koncentráciou testovanej látky v teste a v kontrolných červoch). Ak sa v priebehu vychytávacej fázy nedosiahol ustálený stav, stanovenie kinetických parametrov – hodnoty BAF_k, rýchlostných konštánt vychytávania a eliminácie – možno vykonať pomocou výsledkov pre fázu eliminácie. Zmena koncentrácie testovanej látky v/na červoch sa monitoruje v priebehu oboch fáz testu.

16. Počas vychytávacej fázy sa vykonávajú merania, až kým hodnota BAF nedosiahne plató alebo ustálený stav. Vychytávacia fáza by štandardne mala trvať 28 dní. Z praktických skúseností vyplynulo, že pre viaceré stabilné neutrálne organické látky stačí na dosiahnutie ustáleného stavu 12-dňová až 14-dňová vychytávacia fáza (6) (8) (9).

▼M6

17. Ak sa však ustálený stav nedosiahne do 28 dní, začne sa fáza eliminácie prenesením vystavených máloštetinavcov do nádob obsahujúcich rovnaké médium bez testovanej látky. Fáza eliminácie sa ukončí vtedy, keď sa dosiahne 10 % úroveň koncentrácie nameranej v červoch v 28. deň vychytávacej fázy, alebo po uplynutí maximálneho trvania desať dní. Úroveň rezíduí v červoch na konci fázy eliminácie sa do správy uvedie ako dodatočný sledovaný parameter, napr. ako neeliminované rezíduá (NER). Bioakumulačný faktor (BAF_{ss}) sa podľa možnosti vypočíta ako pomer koncentrácie v červoch (C_a) a v sedimente (C_s) v zrejmom ustálenom stave aj ako kinetický bioakumulačný faktor BAF_K ako pomer rýchlostnej konštanty vychytávania zo sedimentu (k_s) a rýchlostnej konštanty eliminácie (k_e) pri predpoklade kinetiky prvého rádu. Ak sa ustálený stav nedosiahne do 28 dní, hodnotu BAF_K vypočítajte z rýchlostných konštánt vychytávania a eliminácie. Výpočet nájdete v dodatku 2. Ak nie je možné použiť kinetiku prvého rádu, mali by sa použiť zložitejšie modely [dodatok 2 a odkaz (25)].

18. Ak sa ustálený stav nedosiahne do 28 dní, vychytávacia fáza sa prípadne môže predĺžiť, pričom skupiny vystavených červov – ak sú k dispozícii – sa podrobia ďalším meraniam, až kým sa nedosiahne ustálený stav. Súbežne sa však v 28. deň vychytávacej fázy musí začať aj fáza eliminácie.

19. Rýchlostná konštanta vychytávania, rýchlostná konštanta eliminácie (alebo konštanty, ak sa použili zložitejšie modely), kinetický bioakumulačný faktor (BAF_K) a podľa možnosti hranice spoľahlivosti každého z týchto parametrov sa vypočítajú pomocou počítačových modelových rovníc (modely nájdete v dodatku 2). Správnosť odhadu každého modelu možno stanoviť na základe korelačného koeficientu alebo koeficientu určenia (koeficienty blízke hodnote 1 znamenajú vysokú mieru správnosti odhadu).

20. Na zníženie variability výsledkov testu v prípade organických látok s vysokou lipofilitou by sa bioakumulačné faktory mali vyjadriť aj vo vzťahu k obsahu lipidov v testovacích organizmoch a k obsahu organického uhlíka (TOC) v sedimente (akumulačný faktor bioty k sedimentu alebo BSAF ako hodnota TOC sedimentu v kg vydelená obsahom lipidov v červoch v kg). Tento prístup je založený na skúsenostiach a teoretických koreláciách pre vodný kompartment, kde v prípade niektorých tried chemikálií existuje zrejmý vzťah medzi bioakumulačným potenciálom látky a jej lipofilitou, ktorý bol jasne stanovený pri rybách ako modelových organizmoch (14) (25) (27). Existuje tiež vzťah medzi obsahom lipidov v testovacích rybách a pozorovanou bioakumuláciou týchto látok. V prípade bentických organizmov sa zistili podobné korelácie (15) (16) (17) (18). Ak je k dispozícii dostatok tkaniva z červov, obsah lipidov v testovacích živočíchoch možno určiť na rovnakom biologickom materiáli, aký sa použil na určenie koncentrácie testovanej látky. Je však praktické aspoň na začiatku alebo – podľa možnosti – na konci vychytávacej fázy použiť aklimatizované kontrolné živočíchy na odmeranie obsahu lipidov, ktorý sa následne môže použiť na normalizáciu hodnôt BAF.

VALIDITA TESTU

21. Ak má byť test platný, musia platiť tieto podmienky:

— kumulatívna úmrtnosť červov (v kontrolných skupinách a skupinách s aplikovanou látkou) do konca testu by nemala prekročiť 20 % pôvodného počtu,

— okrem toho je potrebné preukázať, že červy sa zahrabávajú do sedimentu, aby sa dosiahla maximálna expozícia. Podrobnosti nájdete v bode 28.

▼M6

OPIS METÓDY

Testovacie druhy

22. V teste možno použiť viaceré druhy vodných máloštetinavcov. Najčastejšie používané druhy sú uvedené v dodatku 6.

23. Testy toxicity (96 hod., len vo vode) by sa mali vykonávať v pravidelných intervaloch (napr. každý mesiac) s referenčnou toxickou látkou, ako je chlorid draselný (KCl) alebo síran meďnatý ($CuSO_4$), (1) na preukázanie zdravotného stavu testovacích živočíchov (1) (6). Ak sa referenčné testy toxicity nevykonávajú v pravidelných intervaloch, dávka organizmov, ktoré sa majú použiť v teste bioakumulácie zo sedimentu, by sa mala skontrolovať pomocou referenčnej toxickej látky. Užitočné informácie o stave živočíchov môže poskytnúť aj meranie obsahu lipidov.

Kultivácia testovacích organizmov

24. S cieľom získať dostatočný počet červov na vykonanie testov bioakumulácie sa červy môžu chovať v stálej jednodruhovej laboratórnej kultúre. Metódy laboratórnej kultivácie pre zvolené testovacie druhy sú zhrnuté v dodatku 6. Podrobnosti nájdete v odkazoch (8) (9) (10) (18) (28) (29) (30) (31) (32).

Prístroje

25. V prípade všetkých častí zariadenia treba dbať na to, aby sa predišlo používaniu materiálov, ktoré sa môžu rozpustiť, absorbovať testované látky alebo vylúhovať iné látky a ktoré majú škodlivé účinky na testovacie živočíchy. Možno použiť štandardné komory pravouhlého alebo valcovitého tvaru vyrobené z chemicky inertného materiálu a s primeranou kapacitou, ktoré zodpovedajú veľkosti násady, t. j. počtu testovacích červov. Treba sa vyhnúť použitiu rúrok z mäkkých plastov na aplikovanie vody alebo vzduchu. Všetky zariadenia, ktoré prichádzajú do kontaktu s testovacími médiami, by mali byť vyrobené z polytetrafluóretylénu, nehrdzavejúcej ocele alebo skla. V prípade látok s vysokým adsorpčným koeficientom, ako sú syntetické pyretroidy, môže byť potrebné silanizované sklo. V týchto prípadoch je potrebné zariadenia po použití zlikvidovať (5). V prípade rádioaktívne označených testovaných látok a prchavých látok sa treba vyhnúť stripovaniu a úniku stripovanej testovanej látky. Na zachytenie všetkých rezíduí odparených zo skúšobných komôr by sa mali použiť zachytávače (napr. sklenené fľaše na premývanie plynu) obsahujúce vhodné absorbenty.

Voda

26. Nadložná voda musí mať takú kvalitu, aby umožnila prežitie testovaného druhu počas celého obdobia aklimatizácie a testovania bez toho, aby sa prejavil nezvyčajný vzhľad alebo správanie. V testoch i laboratórnych kultúrach červov sa ako nadložnú vodu odporúča použiť rekonštituovanú vodu podľa testovacej metódy C.1 (25). Preukázalo sa, že v tejto vode môžu prežiť, rásť a rozmnožovať sa viaceré testovacie druhy (8), pričom je zabezpečená maximálna štandardizácia podmienok testu a kultivácie. Vodu je potrebné charakterizovať aspoň z hľadiska pH, vodivosti a tvrdosti. Užitočné informácie môže pred použitím poskytnúť analýza vody z hľadiska znečisťujúcich mikrolátok (dodatok 4).

27. Voda musí mať počas celého trvania testu stálu kvalitu. Hodnota pH nadložnej vody by mala byť medzi 6 a 9. Celková tvrdosť by na začiatku testu mala byť medzi 90 a 400 mg $CaCO_3$ na liter (7). Rozsahy pH a tvrdosti uvedenej rekonštituovanej vody sú uvedené v testovacej metóde C.1 (25). Ak existuje podozrenie na interakciu medzi iónmi tvrdosti a testovanou

▼M6

látkou, mala by sa použiť voda s nižšou tvrdosťou. V dodatku 4 sú zhrnuté ďalšie kritériá prijateľnej riediacej vody podľa usmernenia OECD TG 210 (34).

Sediment

28. Sediment musí mať takú kvalitu, aby umožnila prežitie a podľa možnosti rozmnožovanie testovacích organizmov počas celého obdobia aklimatizácie a testovania bez toho, aby sa prejavil nezvyčajný vzhľad alebo správanie organizmov. Červy by sa mali zahrabávať do sedimentu. Zahrabávanie môže mať vplyv na expozíciu a následne aj na hodnotu BAF. Preto ak to zakalenie nadložnej vody umožňuje, malo by sa zaznamenať vyhýbanie sedimentu alebo zahrabávanie testovacích organizmov. Červy (v kontrolných skupinách i v skupinách s aplikovanou látkou) by sa mali zahrabať do sedimentu do 24 hodín od pridania do testovacích nádob. Ak sa pozoruje trvalé nezahrabávanie sa alebo vyhýbanie sa sedimentu (napr. viac ako 20 % v priebehu vyše polovicevychytávacej fázy), znamená to, že buď podmienky testovania nie sú vhodné, že testovacie organizmy nie sú zdravé alebo že toto správanie spôsobuje koncentrácia testovanej látky. V takom prípade je potrebné test zastaviť a zopakovať ho za upravených podmienok. Ďalšie informácie o požieraní sedimentu možno získať použitím metód opísaných v odkazoch (35) (36), ktorými sa stanovuje požieranie sedimentu alebo výber častíc pri testovacích organizmoch. Ak to je možné, je potrebné zaznamenať aspoň prítomnosť alebo neprítomnosť fekálnych peliet na povrchu sedimentu, ktoré poukazujú na požieranie sedimentu červami. Tieto informácie je nutné zohľadniť pri interpretácii výsledkov testu, pokiaľ ide o spôsoby expozície.

29. V teste aj laboratórnych kultúrach červov (dodatok 5) sa odporúča použiť umelý sediment založený na umelo pripravenej pôde opísanej v testovacej metóde C.8 (40), lebo prírodné sedimenty dostatočnej kvality nemusia byť k dispozícii po celý rok. Test okrem toho môžu ovplyvniť aj pôvodné organizmy, ako aj možná prítomnosť znečisťujúcich mikrolátok v prírodných sedimentoch. V umelom sedimente môžu prežiť, rásť a rozmnožovať sa viaceré testovacie druhy (8).

30. Umelý sediment je nutné charakterizovať aspoň z hľadiska pôvodu zložiek, rozdelenia veľkosti častíc (percento piesku, siltu a ílu), obsahu organického uhlíka (TOC), obsahu vody a pH. Meranie oxidačno-redukčného potenciálu je voliteľné. Ako testovací a/alebo kultivačný sediment sa však môže použiť prírodný sediment z neznečistených miest (1). Prírodné sedimenty je nutné charakterizovať aspoň z hľadiska pôvodu (miesta odberu), pH a obsahu amoniaku vo vode nachádzajúcej sa v póroch sedimentu, obsahu organického uhlíka (TOC), rozdelenia veľkosti častíc (percento piesku, siltu a ílu) a percentuálneho obsahu vody (6). Ak sa očakáva tvorba amoniaku, odporúča sa, aby sa prírodný sediment pred aplikovaním testovanej látky uviedol na sedem dní do podmienok, ktoré sa použijú v nasledujúcom teste. Na konci obdobia uvádzania do podmienok je nutné odstrániť a zlikvidovať nadložnú vodu. Analýzou sedimentu alebo jeho zložiek pred použitím možno získať užitočné informácie o znečisťujúcich mikrolátkach.

Príprava

31. Manipulácia s prírodnými sedimentmi pred použitím v laboratóriu je opísaná v (1) (6) (44). Príprava umelého sedimentu je opísaná v dodatku 5.

▼M6

Skladovanie

32. Skladovanie prírodných sedimentov v laboratóriu by malo byť čo najkratšie. U.S. EPA (6) odporúča maximálnu dĺžku skladovania osem týždňov pri teplote 4 °C ± 2 °C v tme. V skladovacích nádobách by nad sedimentom nemal byť žiadny uzavretý priestor. Odporúčania na skladovanie umelého sedimentu sú uvedené v dodatku 5.

Aplikácia testovanej látky

33. Sediment sa obohatí testovanou látkou. Postup obohacovania zahŕňa nanesenie testovanej chemikálie na jednu alebo viacero zložiek sedimentu. Napríklad kremenný piesok alebo jeho časť (napr. 10 g kremenného piesku na testovaciu nádobu) možno napustiť roztokom testovanej látky vo vhodnom rozpúšťadle, ktoré sa následne pomaly odparí do sucha. Časť s nánosom možno potom zamiešať do mokrého sedimentu. Pri príprave sedimentu je nutné zohľadniť množstvo piesku, ktorý pochádza zo zmesi testovanej látky a piesku, čiže sediment by sa mal pripraviť s menším množstvom piesku (6).

34. Ak sa použije prírodný sediment, testovanú látku možno pridať obohatením vysušenej časti sedimentu podľa opisu pre umelý sediment alebo primiešaním testovanej látky do mokrého sedimentu s následným odparením prípadne použitého solubilizačného prostriedku. Medzi vhodné rozpúšťadlá, ktoré možno použiť na obohatenie mokrého sedimentu, patrí etanol, metanol, etylénglykolmonometyléter, etylénglykoldimetyléter, dimetylformamid a trietylénglykol (5) (34). Hlavnými kritériami pri výbere vhodného solubilizačného prostriedku by mali byť toxicita a prchavosť rozpúšťadla a rozpustnosť testovanej látky vo vybratom rozpúšťadle. Ďalšie usmernenia o postupoch obohacovania obsahuje Environment Canada (1995) (41). Je nutné zabezpečiť, aby sa testovaná látka pridávaná do sedimentu v sedimente dôkladne a rovnomerne distribuovala. Mali by sa analyzovať replikované podvzorky obohateného sedimentu, aby sa skontrolovali koncentrácie testovanej látky v sedimente a aby sa stanovila úroveň homogenity distribúcie testovanej látky.

35. Keď je obohatený sediment s nadložnou vodou pripravený, je vhodné umožniť rozdelenie testovanej chemikálie medzi sediment a vodnú fázu. To by sa podľa možnosti malo vykonať za rovnakých teplotných a prevzdušňovacích podmienok aké sa použijú v teste. Primeraný čas dosahovania rovnováhy závisí od konkrétneho sedimentu a látky a môže trvať niekoľko hodín až dní a v zriedkavých prípadoch až niekoľko týždňov (štyri až päť týždňov) (28) (42). V tomto teste sa neočakáva dosiahnutie rovnovážneho stavu, ale odporúča sa obdobie dosahovania rovnováhy v trvaní 48 hodín až sedem dní. V závislosti od účelu štúdie, napr. ak sa napodobňujú podmienky životného prostredia, sa obohatený sediment môže nechať dosahovať rovnováhu alebo zrieť dlhšie (11).

VYKONANIE TESTU

Predbežná skúška

36. V záujme optimalizácie podmienok hlavného testovania môže byť užitočné vykonať predbežný experiment zameraný napríklad na voľbu koncentrácie/koncentrácií testovanej látky a trvanie vychytávacej fázy a fázy eliminácie. Počas predbežnej skúšky sa pozoruje a zaznamenáva správanie červov,

▼M6

napríklad vyhýbanie sa sedimentu, teda únik červov zo sedimentu, ktoré môže byť spôsobené testovanou látkou a/alebo samotným sedimentom. Vyhýbanie sa sedimentu sa v predbežnej skúške môže použiť aj ako subletálny parameter na odhad koncentrácií testovanej látky, ktoré sa majú použiť v teste bioakumulácie.

Podmienky expozície

Trvanie vychytávacej fázy

37. Testovacie organizmy sa počas vychytávacej fázy vystavia pôsobeniu testovanej látky. Prvá vzorka sa odoberie po 4 až 24 hodinách od začiatku vychytávacej fázy. Okrem prípadov, v ktorých sa dosiahne rovnováha preukázateľne skôr, by vychytávacia fáza mala trvať maximálne 28 dní (1) (6) (11). Ustálený stav nastáva vtedy, keď: i) je krivka závislosti bioakumulačných faktorov v jednotlivých časoch odberu vzoriek od času rovnobežná s časovou osou, ii) tri po sebe nasledujúce analýzy hodnôt BAF vzoriek odobratých v intervaloch najmenej dvoch dní sa navzájom nelíšia o viac ako ± 20 % a iii) neexistujú významné rozdiely medzi tromi časmi odberu vzoriek (na základe štatistických porovnaní, napr. analýzy rozptylu a regresnej analýzy). Ak sa rovnovážny stav nedosiahne do 28 dní, vychytávaciu fázu možno ukončiť začatím fázy eliminácie a hodnotu BAF_K možno vypočítať z rýchlostných konštánt vychytávania a eliminácie (pozri tiež body 16 až 18).

Trvanie fázy eliminácie

38. Prvá vzorka sa odoberie po 4 až 24 hodinách od začiatku fázy eliminácie, lebo v úvodnom období môže dôjsť k náhlym zmenám v rezíduu tkaniva. Fázu eliminácie sa odporúča ukončiť buď vtedy, keď je koncentrácia testovanej látky nižšia ako 10 % koncentrácie v ustálenom stave, alebo maximálne po desiatich dňoch. Úroveň rezíduí v červoch na konci fázy eliminácie sa do správy uvedie ako sekundárny sledovaný parameter. Toto obdobie však možno stanoviť ako obdobie, počas ktorého je koncentrácia testovanej látky v červoch vyššia ako analytický detekčný limit.

Testovacie organizmy

Počet testovacích červov

39. Počet červov na vzorku musí predstavovať takú hmotnosť tkaniva červov, aby bola hmotnosť testovanej látky na vzorku na začiatku vychytávacej fázy, resp. na konci fázy eliminácie výrazne vyššia ako detekčný limit testovanej látky v biologickom materiáli. V uvedených štádiách vychytávacej fázy a fázy eliminácie je koncentrácia v testovacích živočíchoch zvyčajne pomerne nízka (6) (8) (18). Keďže individuálna hmotnosť mnohých druhov vodných máloštetinavcov je veľmi nízka (5 – 10 mg mokrej hmotnosti na jedinca v prípade *Lumbriculus variegatus* a *Tubifex tubifex*), červy z daného replikátu skúšobnej komory sa môžu na účely váženia a analýzy testovanej chemikálie spojiť. V prípade testovacích druhov s vyššou individuálnou hmotnosťou (napr. *Branchiura sowerbyi*) možno použiť replikáty obsahujúce jedného jedinca, ale v týchto prípadoch by sa počet replikátov mal zvýšiť na päť na bod odberu vzoriek (11). Treba však poznamenať, že druh *B. sowerbyi* nebol zahrnutý do kruhového testu (12), a preto sa neodporúča ako vhodný druh pre túto metódu.

40. Mali by sa použiť červy podobnej veľkosti (informácie o druhu *L. variegatus* nájdete v dodatku 6). Mali by pochádzať z toho istého zdroja a malo by ísť o dospelých jedincov alebo veľké živočíchy tej istej vekovej triedy (pozri dodatok 6). Hmotnosť a vek živočícha môžu mať významný vplyv na hodnoty BAF (napr. v dôsledku rôzneho obsahu lipidov a/alebo prítomnosti vajíčok). Tieto parametre je potrebné presne zaznamenať. Na účely merania priemernej mokrej a suchej hmotnosti sa pred začatím testu odváži podvzorka červov.

▼M6

41. Očakáva sa, že červy druhov *Tubifex tubifex* a *Lumbriculus variegatus* sa počas trvania testu budú rozmnožovať. Neprítomnosť rozmnožovania v teste bioakumulácie by sa mala zaznamenať a vziať do úvahy pri interpretácii výsledkov testu.

Násada

42. Mali by sa použiť vysoké pomery sedimentu k červom a vody k červom, aby sa minimalizovalo znižovanie koncentrácie testovanej látky v sedimente počas vychytávacej fázy a aby sa predišlo poklesu koncentrácie rozpusteného kyslíka. Zvolený stupeň zaťaženia by takisto mal zodpovedať prirodzene sa vyskytujúcim hustotám populácie vybratého druhu (43). Napríklad v prípade druhu *Tubifex tubifex* sa odporúča stupeň zaťaženia 1 – 4 mg tkaniva červov (mokrá hmotnosť) na gram mokrého sedimentu (8) (11). V odkazoch (1) a (6) sa pre druh *L. variegatus* odporúča stupeň zaťaženia ≤ 1 g suchej hmotnosti tkaniva červov na 50 g organického uhlíka v sedimente.

43. Červy, ktoré sa použijú v teste, sa odoberú z kultúry preosiatím kultivačného sedimentu. Živočíchy (dospelé alebo veľké červy bez známok nedávnej fragmentácie) sa prenesú do sklenených misiek (napr. Petriho misiek) obsahujúcich čistú vodu. Ak sa podmienky testovania líšia od podmienok kultivácie, mala by stačiť fáza aklimatizácie v trvaní 24 hodín. Pred vážením sa má z červov odstrániť nadbytočná voda. Na tieto účely možno červy opatrne uložiť na navlhčenú papierovú servítku. Neodporúča sa na sušenie červov používať absorpčný papier, lebo im to môže spôsobiť stres alebo poškodenie. Brunson et al. (1998) odporučili použiť nevytreté červy s hmotnosťou približne 1,33-násobku cieľovej biomasy. Týchto dodatočných 33 % zodpovedá rozdielu medzi vytretými a nevytretými červami (28).

44. Na začiatku vychytávacej fázy (0. deň testu) sa testovacie organizmy vyberú z aklimatizačnej komory a náhodne rozdelia do nádob (napr. Petriho misiek) obsahujúcich rekonštituovanú vodu, a to tak, že skupiny dvoch červov sa pridávajú do jednotlivých nádob, kým každá nádoba neobsahuje desať červov. Každá z týchto skupín červov sa potom náhodne prenesie do samostatných testovacích nádob, napr. pomocou jemnej oceľovej pinzety. Testovacie nádoby sa potom inkubujú za testovacích podmienok.

Kŕmenie

45. Vzhľadom na nízky obsah živín v umelom sedimente by sa do sedimentu mal pridať zdroj potravy. S cieľom vyhnúť sa podhodnoteniu expozície testovacích organizmov, napr. selektívnym kŕmením nekontaminovanou potravou, by sa potrava potrebná na rozmnožovanie a rast testovacích organizmov mala do sedimentu pridať len raz pred aplikáciou testovanej látky alebo počas nej (pozri dodatok 5).

Pomer sediment – voda

46. Odporúčaný pomer sediment – voda je 1: 4 (45). Tento pomer sa považuje za vhodný na udržanie koncentrácie kyslíka na vhodnej úrovni a na zabránenie hromadeniu amoniaku v nadložnej vode. Obsah kyslíka v nadložnej vode by sa mal udržiavať na ≥ 40 % saturácie. Nadložná voda v testovacích nádobách by sa mala jemne prevzdušňovať (napr. dve až štyri bubliny za sekundu) pomocou Pasteurovej pipety umiestnenej približne 2 cm nad povrchom sedimentu, aby sa minimalizovalo narušenie sedimentu.

▼M6

Svetlo a teplota

47. Fotoperióda v kultúre a v teste je 16 hodín (1) (6). Intenzita svetla v testovacom priestore by sa mala udržiavať približne na 500 – 1 000 lx. Teplota by počas celého testu mala byť 20 ± 2 °C.

Testované koncentrácie

48. Na stanovenie kinetiky vychytávania sa používa jedna testovaná koncentrácia (čo najnižšia), ale možno použiť aj druhú (vyššiu) koncentráciu [napr. (46)]. V takom prípade sa vzorky odoberajú a analyzujú v ustálenom stave alebo po 28 dňoch s cieľom potvrdiť nameranú hodnotu BAF pri nižšej koncentrácii (11). Vyššia koncentrácia by sa mala zvoliť tak, aby sa vylúčili nepriaznivé účinky (napr. výberom približne 1 % koncentrácie spôsobujúcej najnižší známy chronický účinok EC_x získanej z príslušných štúdií chronickej toxicity). Nižšia testovaná koncentrácia by mala byť výrazne vyššia ako detekčný limit v sedimente a biologických vzorkách pre použitú analytickú metódu. Ak je účinná koncentrácia testovanej látky blízko analytickému detekčnému limitu, odporúča sa použiť rádioaktívne označenú testovanú látku s vysokou špecifickou rádioaktivitou.

Replikáty s aplikovanou chemikáliou a kontrolné replikáty

49. Minimálny počet replikátov s aplikovanou chemikáliou na meranie kinetických vlastností by mal byť tri na bod odberu vzorky (11) počas vychytávacej fázy a fázy eliminácie. Ďalšie replikáty sa majú použiť napr. pre voliteľné dodatočné dni odberu vzoriek. Vo fáze eliminácie sa pripraví zodpovedajúci počet replikátov s neobohateným sedimentom a nadložnou vodou tak, aby bolo možné na konci vychytávacej fázy preniesť červy s aplikovanou chemikáliou z určených nádob s aplikovanou látkou do nádob bez aplikovanej látky. Celkový počet replikátov s aplikovanou látkou by mal byť dostatočný na vychytávaciu fázu i fázu eliminácie.

50. Alternatívne sa červy určené na odber vzoriek počas fázy eliminácie môžu exponovať v jednej veľkej nádobe obsahujúcej obohatený sediment z tej istej dávky, aká sa použila na stanovenie kinetiky vychytávania. Je potrebné preukázať, že testovacie podmienky (napr. hĺbka sedimentu, pomer sediment – voda, násada, teplota, kvalita vody) sú porovnateľné s replikátmi určenými na vychytávaciu fázu. Na konci vychytávacej fázy sa z tejto nádoby majú odobrať vzorky vody, sedimentu a červov na analýzu a dostatočný počet veľkých červov, ktoré nejavia žiadne známky nedávnej fragmentácie, opatrne sa vyberú a premiestnia do replikátov pripravených na fázu eliminácie (napr. desať organizmov na replikačnú nádobu).

51. Ak sa nepoužije iné rozpúšťadlo ako voda, malo by sa použiť aspoň deväť replikátov negatívnej kontrolnej skupiny (aspoň tri vzorky na začiatku, tri na konci vychytávania a tri na konci eliminácie) na biologickú analýzu a analýzu pozadia. Ak sa na aplikáciu testovanej látky použije solubilizačný prostriedok, je potrebné vykonať analýzu kontrolnej skupiny s rozpúšťadlom (vzorky aspoň z troch replikátov na začiatku, troch na konci fázy vychytávania a troch na konci fázy eliminácie). V tomto prípade je na odber vzoriek na konci vychytávacej fázy potrebné použiť aspoň štyri replikáty negatívnej kontrolnej skupiny (bez rozpúšťadla). Tieto replikáty možno biologicky porovnať s kontrolnou vzorkou s rozpúšťadlom s cieľom získať informácie o možnom vplyve rozpúšťadla na testovacie organizmy. Podrobnosti sú uvedené v dodatku 3.

▼M6

Frekvencia meraní kvality vody

52. Počas vychytávacej fázy a fázy eliminácie by sa v nadložnej vode mali merať minimálne tieto parametre kvality vody:

Teplota	v jednej nádobe pre každú koncentráciu aplikovanej látky na deň odberu vzoriek a v jednej kontrolnej nádobe raz týždenne a na začiatku a na konci vychytávacej fázy a fázy eliminácie; možno zaznamenávať aj teplotu v okolitom médiu (okolitý vzduch alebo vodný kúpeľ) alebo v jednej reprezentatívnej testovacej nádobe, napr. nepretržite alebo v hodinových intervaloch,
Obsah rozpusteného kyslíka	v jednej nádobe pre každú koncentráciu aplikovanej látky a v jednej kontrolnej nádobe na deň odberu vzoriek, vyjadrený ako mg/l a % ASV (rozpustnosť vzdušného kyslíka),
Prívod vzduchu	kontrolovaný aspoň raz za deň (pracovné dni) a upravený podľa potreby,
pH	v jednej nádobe pre každú koncentráciu aplikovanej látky na deň odberu vzoriek a v jednej kontrolnej nádobe raz týždenne a na začiatku a na konci vychytávacej fázy a fázy eliminácie,
Celková tvrdosť vody	aspoň v jednej nádobe s aplikovanou látkou a v jednej kontrolnej testovacej nádobe na začiatku a na konci vychytávacej fázy a fázy eliminácie, vyjadrená ako mg/l $CaCO_3$,
Celkový obsah amoniaku	aspoň v jednej nádobe s aplikovanou látkou a v jednej kontrolnej testovacej nádobe na začiatku a na konci vychytávacej fázy a fázy eliminácie, vyjadrený ako mg/l NH_4^+ alebo NH_3, alebo celkový amoniak –N.

Odber vzoriek a analýza červov, sedimentu a vody

Časový harmonogram odberov vzoriek

53. Príklady harmonogramu odberov vzoriek v prípade 28-dňovej vychytávacej fázy a 10-dňovej fázy eliminácie sú uvedené v dodatku 3.

54. Odoberte vzorky vody a sedimentu zo skúšobných komôr na účely stanovenia koncentrácie testovanej látky pred pridaním červov a počas vychytávacej fázy i fázy eliminácie. V priebehu testu sa stanovia koncentrácie testovanej látky v červoch, sedimente a vode s cieľom monitorovať distribúciu testovanej látky do kompartmentov testovacieho systému.

55. Vzorky červov, sedimentu a vody odoberte aspoň šesťkrát v priebehu vychytávacej fázy i fázy eliminácie.

56. Pokračujte v odbere vzoriek, kým sa nedosiahne plató (ustálený stav) (pozri dodatok 1), alebo počas 28 dní. Ak sa plató nedosiahne do 28 dní, začnite fázu eliminácie. Na začiatku fázy eliminácie preneste určené červy do replikačných komôr obsahujúcich neobohatený sediment a vodu (pozri aj body 17 a 18).

Odber a príprava vzoriek

57. Získajte vzorky dekantáciou, odsaním alebo pipetovaním objemu dostatočného na odmeranie množstva testovanej látky vo vzorke.

58. Zvyšná nadložná voda sa opatrne dekantuje alebo odsaje z testovacej komory (testovacích komôr). Vzorky sedimentu by sa mali odoberať opatrne, aby sa červy čo najmenej rušili.

▼M6

59. V čase odberu vzoriek vyberte všetky červy z testovaného replikátu, napr. tak, že suspendujete sediment s nadložnou vodou a rozotriete obsah každého replikátu na plytkú misku. Červy z nej potom vyberte jemnou oceľovou pinzetou. Rýchlo ich prepláchnite vodou v plytkom pohári alebo na oceľovej miske. Odstráňte prebytočnú vodu. Červy opatrne preneste do vopred odváženej nádoby a odvážte ich. Usmrťte červy zmrazením (napr. ≤ –18 °C). Zaznamenajte prítomnosť a množstvo zámotkov a/alebo mladých jedincov.

60. Vo všeobecnosti sa červy majú odvážiť a usmrtiť ihneď po odbere vzorky bez fázy vyprázdnenia čriev, aby sa získala konzervatívna hodnota BAF, ktorá zahŕňa kontaminovaný obsah čriev, a aby sa zabránilo strate telesných rezíduí počas obdobia vyprázdňovania čriev len vo vode (8). Očakáva sa, že látky s hodnotami log K_{ow} vyššími ako 5 sa nebudú výrazne eliminovať v prípadnom období vyprázdňovania čriev len vo vode, kým látky s hodnotou log K_{ow} nižšou ako 4 sa môžu eliminovať v značnom množstve (47).

61. Vo fáze eliminácie červy vyprázdňujú črevá do čistého sedimentu. To znamená, že merania bezprostredne pred fázou eliminácie zahŕňajú sediment s kontaminovaným obsahom čriev, zatiaľ čo pri meraniach po prvých 4 – 24 hodinách fázy eliminácie sa predpokladá, že väčšina kontaminovaného obsahu čriev sa nahradí čistým sedimentom (11) (47). Koncentrácia v červoch z tejto vzorky sa potom môže považovať za koncentráciu v tkanive po vyprázdnení čriev. Na zohľadnenie zriedenia koncentrácie testovanej látky nekontaminovaným sedimentom počas fázy eliminácie možno hmotnosť obsahu čriev odhadnúť na základe pomeru mokrej hmotnosti a hmotnosti popola alebo pomeru suchej hmotnosti a hmotnosti popola červov.

62. Ak je účelom osobitnej štúdie merať biodostupnosť a skutočné tkanivové rezíduá v testovacích organizmoch, potom sa aspoň podvzorka živočíchov s aplikovanou látkou (napr. z ďalších troch replikačných nádob), ktorá sa podľa možnosti odobrala v ustálenom stave, má odvážiť, nechať vyprázdňovať v čistej vode počas 6 hodín (47) a pred analýzou znova odvážiť. Údaje o hmotnosti červov a telesnej koncentrácii v tejto podvzorke možno potom porovnať s hodnotami získanými z nevyprázdnených červov. Červy určené na meranie eliminácie by sa pred prenosom do čistého sedimentu nemali vyprázdniť, aby sa minimalizoval ďalší stres živočíchov.

63. Vzorky vody, sedimentu a červov by sa podľa možnosti mali analyzovať ihneď (t. j. do jedného až dvoch dní) po odobratí, aby sa predišlo degradácii alebo iným stratám a aby bolo možné vypočítať približnú rýchlosť vychytávania a eliminácie v priebehu testu. Okamžitou analýzou sa tiež predíde oddialeniu stanovenia dosiahnutia plató.

64. Ak sa analýza nevykoná ihneď, vzorky by sa mali skladovať za primeraných podmienok. Pred začiatkom štúdie získajte informácie o stabilite a vhodných podmienkach skladovania danej testovanej látky (napr. o trvaní a teplote skladovania, postupoch extrakcie atď.). Ak tieto informácie nie sú k dispozícii a považujú sa za potrebné, na stanovenie stability počas skladovania možno súbežne analyzovať obohatené kontrolné tkanivá.

Kvalita analytickej metódy

65. Celý postup v zásade závisí od správnosti, presnosti a citlivosti metódy použitej na analýzu testovanej látky. Treba preto experimentálne overiť, či sú presnosť a reprodukovateľnosť chemickej analýzy, ako aj výťažok testovanej látky zo vzoriek vody, sedimentu a červov pre danú metódu uspokojivé. Takisto je potrebné overiť, či testovaná látka nie je zistiteľná v kontrolných komorách vo vyšších koncentráciách ako v pozadí. Ak je to potrebné,

▼M6

opravte hodnoty C_w, C_s a C_a podľa hodnôt výťažku a hodnôt v pozadí pre kontrolné vzorky. So všetkými vzorkami počas celého testu zaobchádzajte tak, aby sa minimalizovala kontaminácia a strata (napr. v dôsledku adsorpcie testovanej látky na zariadenie na odber vzoriek).

66. Je potrebné zaznamenať a uviesť do správy celkový výťažok a výťažok testovanej látky v červoch, sedimente a vo vode, ako aj v zachytávačoch obsahujúcich absorbenty na zadržanie odparenej testovanej látky, ak sa použijú.

67. Keďže sa odporúča použiť rádioaktívne označené látky, je možné analyzovať celkovú rádioaktivitu (t. j. východiskovej látky a produktov degradácie). Ak to je však analyticky uskutočniteľné, dôležité informácie možno získať kvantifikáciou východiskovej testovanej látky a produktov degradácie v ustálenom stave alebo na konci vychytávacej fázy. Ak sa majú vykonať tieto merania, vzorky sa podrobia vhodným extrakčným postupom, aby bolo možné samostatne kvantifikovať východiskovú látku. Ak zistený produkt degradácie predstavuje významné percento (napr. > 10 %) rádioaktivity nameranej v testovacích organizmoch v ustálenom stave alebo na konci vychytávacej fázy, odporúča sa identifikovať tieto produkty degradácie (5).

68. V dôsledku nízkej individuálnej biomasy často nie je možné stanoviť koncentráciu testovanej látky v jednotlivých červoch okrem prípadu, keď sa ako testovací druh použije *Branchiura sowerbyi* (40 – 50 mg mokrej hmotnosti na červa) (11). Spájanie jedincov odobratých z danej testovacej nádoby je preto prípustné, ale obmedzujú sa tým štatistické postupy, ktoré možno použiť pri spracúvaní výsledkov. Ak sa má použiť konkrétny štatistický postup a spoľahlivosť, v teste sa musí použiť vhodný počet testovacích živočíchov a/alebo replikačných testovacích komôr, ktorý umožňuje želané spájanie vzoriek, postup a spoľahlivosť.

69. Odporúča sa vyjadriť hodnotu BAF ako funkciu celkovej mokrej hmotnosti i celkovej suchej hmotnosti a v prípade potreby (napr. v prípade vysoko lipofilných látok) aj ako funkciu obsahu lipidov a hodnoty TOC sedimentu. Na stanovenie obsahu lipidov sa majú použiť vhodné metódy (48) (49). Ako štandardnú metódu (48) možno odporúčať extrakciu chloroformom/metanolom (50). S cieľom vyhnúť sa použitiu chlórovaných rozpúšťadiel by sa mala použiť upravená metóda podľa Bligha a Dyera (50) opísaná v literatúre (51), ktorá sa otestovala v kruhovom teste. Keďže rôznymi metódami sa nedospeje k rovnakým hodnotám (48), je dôležité uviesť podrobné informácie o použitej metóde. Ak je to možné, t. j. ak je k dispozícii dostatočné množstvo tkaniva z červov, obsah lipidov sa odmeria na rovnakej vzorke alebo extrakte, aké sa použili na analýzu testovanej látky, lebo pred chromatografickou analýzou je často nutné lipidy z extraktu odstrániť (5). Je však praktické aspoň na začiatku alebo – podľa možnosti – na konci vychytávacej fázy použiť na meranie obsahu lipidov aklimatizované kontrolné živočíchy, napr. v troch vzorkách.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

70. Krivka vychytávania testovanej látky sa získa tak, že sa na aritmetickej osi zakreslí jej koncentrácia v/na červoch počas vychytávacej fázy v závislosti

▼M6

od času. Ak krivka dosiahne plató, vypočítajte hodnotu BAF_{ss} v ustálenom stave:

$$\frac{C_a \text{ vustálenom stave alebo v28. deň (priemerná)}}{C_s \text{ vustálenom stave alebo v28. deň (priemerná)}}$$

71. Stanovte kinetický bioakumulačný faktor (BAFK) ako pomer ks/ke. Konštanta eliminácie (ke) sa zvyčajne stanoví podľa krivky eliminácie (t. j. znázornenia koncentrácie testovanej látky v červoch počas fázy eliminácie). Rýchlostná konštanta vychytávania ks sa potom vypočíta z kinetiky krivky vychytávania. Uprednostňovanou metódou stanovenia hodnoty BAFK a rýchlostných konštánt ks a ke sú nelineárne metódy odhadovania parametrov pomocou počítača (pozri dodatok 2). Ak je zrejmé, že eliminácia nie je prvého rádu, je potrebné použiť komplexnejšie modely (25) (27) (52).

72. Akumulačný faktor bioty k sedimentu (BSAF) sa stanoví normalizáciou hodnoty BAFK podľa obsahu lipidov v červoch a celkového obsahu organického uhlíka v sedimente.

Interpretácia výsledkov

73. Ak sa namerané koncentrácie testovanej látky pohybujú na úrovni blízkej detekčnému limitu použitej analytickej metódy, výsledky treba interpretovať s opatrnosťou.

74. Jasne vymedzené krivky vychytávania a eliminácie sú známkou dobrej kvality údajov o bioakumulácii. Vo všeobecnosti by hranice spoľahlivosti pre hodnoty BAF v dobre navrhnutých štúdiách nemali presiahnuť 25 % (5).

Protokol o skúške

75. Protokol o skúške musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka

— fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti, napr. log K_{ow}, rozpustnosť vo vode,

— chemické identifikačné údaje, zdroj testovanej látky, identita a koncentrácia akéhokoľvek použitého rozpúšťadla,

— ak sa použije rádioaktívne označená látka, presná poloha označených atómov, špecifická rádioaktivita a percento rádioaktivity spojenej s nečistotami.

Testovacie druhy

— vedecký názov, kmeň, pôvod, všetky predúpravy, aklimatizácia, vek, rozsah hmotností atď.

Podmienky testu

— použitý postup testu (napr. statický, semistatický alebo prietokový),

— typ a charakteristiky použitého osvetlenia a dĺžka fotoperiódy/fotoperiód,

— koncepcia testu [napr. počet, materiál a veľkosť skúšobných komôr, objem vody, hmotnosť a objem sedimentu, rýchlosť výmeny celého objemu vody (pri prietokových alebo semistatických postupoch), akékoľvek prevzdušňovanie pred testom a počas neho, počet replikátov, počet červov na replikát, počet testovaných koncentrácií, dĺžka vychytávacej fázy a fázy eliminácie, frekvencia odberov vzoriek],

▼M6

— metóda prípravy a aplikácie testovanej látky, ako aj dôvody pre výber konkrétnej metódy,

— nominálne testované koncentrácie,

— zdroj zložiek umelej vody a sedimentu alebo – ak sa použije prírodné médium – pôvod vody a sedimentu, opis všetkých predúprav, výsledky preukazujúce schopnosť testovacích živočíchov žiť a/alebo rozmnožovať sa v použitom médiu, charakteristiky sedimentu [pH a obsah amoniaku vo vode nachádzajúcej sa v póroch sedimentu (prírodné usadeniny), obsah organického uhlíka (TOC), rozdelenie veľkosti častíc (percento piesku, siltu a ílu), percentuálny obsah vody a všetky ostatné vykonané merania] a vlastnosti vody [pH, tvrdosť, vodivosť, teplota, koncentrácia rozpusteného kyslíka, úroveň zostatkového chlóru (ak sa merala) a všetky ostatné vykonané merania],

— menovitá a nameraná suchá hmotnosť v % mokrej hmotnosti (alebo pomer suchej hmotnosti k mokrej hmotnosti) umelého sedimentu, nameraná suchá hmotnosť v % mokrej hmotnosti (alebo pomer suchej hmotnosti k mokrej hmotnosti) sedimentov z terénu,

— kvalita vody v skúšobných komorách charakterizovaná teplotou, pH, obsahom amoniaku, celkovou tvrdosťou a koncentráciou rozpusteného kyslíka,

— podrobné informácie o manipulácii so vzorkami vody, sedimentu a červov vrátane údajov o príprave, skladovaní, postupoch obohacovania, extrakcii a analytických postupoch (a presnosti) merania obsahu testovanej látky a lipidov a výťažku testovanej látky.

Výsledky

— úmrtnosť kontrolných červov a červov v jednotlivých skúšobných komorách a všetky pozorované subletálne účinky vrátane nezvyčajného správania (napr. vyhýbanie sa sedimentu, prítomnosť alebo neprítomnosť fekálnych peliet, neprítomnosť rozmnožovania),

— nameraná suchá hmotnosť v % mokrej hmotnosti (alebo pomer suchej hmotnosti k mokrej hmotnosti) sedimentu a testovacích organizmov (užitočné na účely normalizácie),

— obsah lipidov v červoch,

— krivky znázorňujúce vychytávaciu a eliminačnú kinetiku testovanej látky v červoch a čas do dosiahnutia ustáleného stavu,

— hodnoty C_a, C_s a C_w (so štandardnou odchýlkou a rozsahom, ak je to vhodné) pre všetky časy odberu vzoriek (C_a vyjadrené v g kg^{-1} mokrej a suchej hmotnosti celého tela, C_s vyjadrené v g kg^{-1} mokrej a suchej hmotnosti sedimentu a C_w v mg l^{-1}). Ak sa požaduje akumulačný faktor bioty k sedimentu (BSAF, pozri vymedzenie pojmu v dodatku 1) (napr. na porovnanie výsledkov z dvoch alebo viacerých testov vykonaných so živočíchmi s odlišným obsahom lipidov), hodnota C_a by sa navyše mala vyjadriť ako g kg^{-1} obsahu lipidov v organizme a hodnota C_s ako g kg^{-1} organického uhlíka (OC) v sedimente,

— hodnota BAF (vyjadrená v kg mokrého sedimentu kg^{-1} mokrých červov), konštanta vyjadrujúca rýchlosť sorpcie látok sedimentu k_s (vyjadrená v g mokrého sedimentu kg^{-1} mokrých červov na deň d^{-1}) a rýchlostná konštanta eliminácie k_e (vyjadrená v dňoch d^{-1}). Okrem toho možno uviesť aj hodnotu BSAF (vyjadrenú v kg OC sedimentu kg^{-1} obsahu lipidov v červoch),

▼**M6**

— neeliminované rezíduá (NER) na konci fázy eliminácie,

— ak sa merajú: percentá východiskovej látky, produktov degradácie a viazaných rezíduí (t. j. percento testovanej látky, ktorú nemožno extrahovať bežnými metódami extrakcie) zistené v testovacích živočíchoch,

— metódy použité na štatistické analýzy údajov.

Vyhodnotenie výsledkov

— súlad výsledkov s kritériami validity uvedenými v bode 21,

— neočakávané alebo nezvyčajné výsledky, napr. neúplná eliminácia testovanej látky z testovacích živočíchov. V takých prípadoch môžu užitočné informácie poskytnúť výsledky z prípadnej predbežnej štúdie.

▼M6

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov a jednotky

Umelý sediment alebo umelo pripravený, rekonštituovaný alebo syntetický sediment je zmes materiálov použitých na napodobnenie fyzických zložiek prírodného sedimentu.

Bioakumulácia je zvyšovanie koncentrácie testovanej látky v alebo na organizme vzhľadom na koncentráciu testovanej látky v okolitom médiu. Bioakumulácia je výsledkom procesov biokoncentrácie a biomagnifikácie (pozri ďalej).

Bioakumulačný faktor (BAF) v akomkoľvek čase počas vychytávacej fázy tohto testu bioakumulácie je koncentrácia testovanej látky v/na testovacom organizme (C_a v g kg^{-1} mokrej alebo suchej hmotnosti) vydelená koncentráciou látky v okolitom médiu (C_s ako g kg^{-1} mokrej alebo suchej hmotnosti sedimentu). V záujme súladu s jednotkami parametrov C_a a C_s sa hodnota BAF uvádza v jednotkách kg sedimentu kg^{-1} červov (15).

Bioakumulačné faktory vypočítané priamo na základe pomeru konštanty vyjadrujúcej rýchlosť sorpcie látok sedimentu a rýchlostnej konštanty eliminácie (k_s, resp. k_e, pozri ďalej) sa označujú ako kinetický bioakumulačný faktor (BAF_K).

Biokoncentrácia je zvyšovanie koncentrácie testovanej látky v alebo na organizme, ktoré je výsledkom výlučne absorpcie povrchu telom, vzhľadom na koncentráciu testovanej látky v okolitom médiu.

Biomagnifikácia je zvyšovanie koncentrácie testovanej látky v alebo na organizme, ktoré je dôsledkom najmä vychytávania z kontaminovanej potravy alebo koristi, vzhľadom na koncentráciu testovanej látky v potrave alebo koristi. Biomagnifikácia môže viesť k prenosu alebo akumulácii testovanej látky v rámci potravinového reťazca.

Akumulačný faktor bioty k sedimentu (BSAF) je koncentrácia testovanej látky v ustálenom stave v/na testovacom organizme normalizovaná z hľadiska obsahu lipidov vydelená koncentráciou testovanej látky v ustálenom stave v sedimente normalizovanou z hľadiska obsahu organického uhlíka. Hodnota C_a je potom vyjadrená ako $g \cdot kg^{-1}$ obsahu lipidov v organizme a C_s ako $g \cdot kg^{-1}$ obsahu organických látok v sedimente.

Obdobie uvádzania do podmienok sa používa na stabilizáciu mikrobiálnej zložky sedimentu a na odstránenie napr. amoniaku pochádzajúceho zo zložiek sedimentu pred obohatením sedimentu testovanou látkou. Po uvedení do podmienok sa zvyčajne odstráni nadložná voda.

Eliminácia testovanej látky je strata tejto látky z tkaniva testovacieho organizmu aktívnymi alebo pasívnymi procesmi, ku ktorým dochádza bez ohľadu na prítomnosť alebo neprítomnosť testovanej látky v okolitom médiu.

Fáza eliminácie je čas nasledujúci po prenose testovacích organizmov z kontaminovaného média do média bez obsahu testovanej látky, počas ktorého sa skúma eliminácia (alebo čistá strata) látky z testovacích organizmov.

Rýchlostná konštanta eliminácie (k_e) je číselná hodnota vyjadrujúca rýchlosť znižovania koncentrácie testovanej látky v/na testovacom organizme po prenose testovacích organizmov z média obsahujúceho testovanú látku do média bez chemikálie. Hodnota k_e je vyjadrená v dňoch d^{-1}.

▼M6

Obdobie dosahovania rovnováhy sa používa na umožnenie rozdelenia testovanej látky medzi pevnú fázu, vodu nachádzajúcu sa v póroch sedimentu a nadložnú vodu pred obohatením sedimentu testovanou látkou a pred pridaním testovacích organizmov.

Rozdeľovacia konštanta oktanol – voda (K_{ow}) je pomer rozpustnosti látky v n-oktanole a vo vode v rovnovážnom stave, niekedy vyjadrený aj ako P_{ow}. Logaritmus K_{ow} (log K_{ow}) sa používa na vyjadrenie potenciálu látky na bioakumuláciu vo vodných organizmoch.

Rozdeľovacia konštanta organický uhlík – voda (K_{oc}) je pomer koncentrácie látky v/na frakcii sedimentu tvorenej organickým uhlíkom a koncentrácie látky vo vode v rovnovážnom stave.

Nadložná voda je voda nachádzajúca sa v testovacej nádobe nad sedimentom.

Plató alebo **ustálený stav** sa vymedzuje ako rovnováha medzi procesmi vychytávania a eliminácie, ku ktorým dochádza súčasne počas expozičnej fázy. Pri grafickom znázornení závislosti hodnoty BAF v jednotlivých časoch odberu vzoriek od času nastáva ustálený stav vtedy, keď sa priebeh krivky stane rovnobežným s časovou osou a tri po sebe idúce analýzy BAF uskutočnené na vzorkách odobratých minimálne v dvojdňových intervaloch sa od seba neodlišujú o viac ako 20 % a medzi týmito tromi časmi odberu vzoriek neexistujú štatisticky významné rozdiely. V prípade testovaných látok, ktoré sa vychytávajú pomalšie, je vhodnejšie použiť intervaly v trvaní sedem dní (5).

Voda nachádzajúca sa v póroch sedimentu alebo intersticiálna voda je voda nachádzajúca sa v priestore medzi časticami sedimentu alebo pôdy.

Konštanta vyjadrujúca rýchlosť sorpcie látok sedimentu (k_s) je číselná hodnota vyjadrujúca rýchlosť zvyšovania koncentrácie testovanej látky v/na testovacom organizme v dôsledku vychytávania zo sedimentovej fázy. Hodnota k_s je vyjadrená v g sedimentu kg^{-1} červov na deň d^{-1}.

Obohatený sediment je sediment, do ktorého bola pridaná testovaná látka.

Rovnovážny bioakumulačný faktor (BAFss) je BAF v ustálenom stave, ktorý sa v priebehu dlhšieho obdobia výrazne nemení, pričom koncentrácia testovanej látky v okolitom médiu (C_s ako g kg^{-1} mokrej alebo suchej hmotnosti sedimentu) je počas tohto obdobia konštantná.

Vychytávacia fáza alebo expozičná fáza je čas, počas ktorého sú testovacie organizmy vystavené pôsobeniu testovanej látky.

▼M6

Dodatok 2

Výpočet parametrov vychytávania a eliminácie

Hlavným sledovaným parametrom testu bioakumulácie je bioakumulačný faktor BAF. Nameranú hodnotu BAF možno vypočítať tak, že koncentrácia testovanej látky v testovacom organizme C_a sa vydelí koncentráciou testovanej látky v sedimente C_s v ustálenom stave. Ak sa počas vychytávacej fázy nedosiahne ustálený stav, hodnota BAF sa vypočíta rovnakým spôsobom pre 28. deň. Treba však uviesť, či je hodnota BAF založená na koncentráciách v ustálenom stave alebo nie.

Uprednostňovaným spôsobom stanovenia kinetického bioakumulačného faktora (BAF_K), konštanty vyjadrujúcej rýchlosť sorpcie látok sedimentu (k_s) a rýchlostnej konštanty eliminácie (k_e) sú nelineárne metódy odhadovania parametrov pomocou počítača. S použitím časových radov priemerných akumulačných faktorov (C_a, priemerné hodnoty pre každý deň odberu vzoriek/C_s, priemerné hodnoty pre každý deň odberu vzoriek = AF) vychytávacej fázy na základe mokrej hmotnosti červov a sedimentu a na základe modelovej rovnice:

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[rovnica 1]}$$

kde AF(t) je pomer koncentrácie testovanej látky v červoch a jej koncentrácie v sedimente v ktoromkoľvek časovom bode (t) vychytávacej fázy, tieto počítačové programy vypočítajú hodnoty BAF_K, k_s a k_e.

Ak sa počas vychytávacej fázy dosiahne ustálený stav (t. j. $t = \infty$), rovnicu 1 možno skrátiť na:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[rovnica 2]}$$

kde

k_s = rýchlostná konštanta vychytávania v tkanive [g sedimentu kg^{-1} červov na deň d^{-1}],

k_e = rýchlostná konštanta eliminácie [d^{-1}]

Potom $k_s/k_e \times C_s$ je prístup k výpočtu koncentrácie testovanej látky v tkanive červov v ustálenom stave ($C_{a,ss}$).

Akumulačný faktor bioty k sedimentu (BSAF) sa má vypočítať takto:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

kde foc je frakcia organického uhlíka v sedimente a flip je frakcia lipidov v červoch, pričom obidve hodnoty sú založené na suchej alebo mokrej hmotnosti.

Vzhľadom na časový rad hodnôt koncentrácie možno kinetiku eliminácie modelovať s využitím týchto modelových rovníc a metódy odhadu nelineárnych parametrov založenej na počítačovom výpočte.

Ako základný východiskový bod sa odporúča použiť priemerné namerané telesné rezíduá na konci vychytávacej fázy. Hodnoty modelované/odhadnuté podľa vychytávacej fázy by sa mali použiť len vtedy, keď sa napr. nameraná hodnota významne odchyľuje od modelovaného telesného rezídua. Informácie o alternatívnej predexpozícii červov určených na stanovenie eliminácie nájdete aj v bode 50. Podľa tohto prístupu sa predpokladá, že vzorky týchto predexponovaných červov poskytujú v 0. deň fázy eliminácie realistickú hodnotu telesného rezídua, z ktorej možno vychádzať pri stanovovaní kinetiky eliminácie.

▼M6

Ak dátové body zakreslené v závislosti od času poukazujú na konštantný exponenciálny pokles koncentrácie testovanej látky v živočíchoch, na opísanie časového priebehu eliminácie možno použiť jednokompartmentový model (rovnica 4).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[rovnica 3]}$$

Procesy eliminácie sa niekedy javia ako dvojfázové, pričom počas počiatočnej fázy vykazujú rýchly pokles hodnoty C_a, ktorý sa mení na pomalšiu stratu testovaných látok v neskoršej fáze eliminácie (8) (19) (25). Dve fázy možno interpretovať na základe predpokladu, že v organizme existujú dva rôzne kompartmenty, z ktorých sa testovaná látka stráca rôznymi rýchlosťami. V týchto prípadoch je potrebné si preštudovať konkrétnu literatúru (15) (16) (17) (25).

Dvojkompartmentová eliminácia je opísaná napr. touto rovnicou (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad \text{[rovnica 4]}$$

A a B predstavujú veľkosť kompartmentov (v percente celkového tkanivového rezídua), kde A je kompartment s rýchlou stratou látky a B kompartment s pomalou stratou testovanej látky. Súčet A a B sa rovná 100 % celého objemu kompartmentov živočícha v ustálenom stave. Hodnoty k_a a k_b predstavujú príslušné konštanty eliminácie [d^{-1}]. Ak sa dvojkompartmentový model použije na údaje o depurácii, rýchlostná konštanta vychytávania k_s sa môže stanoviť takto (53) (54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \qquad \text{[rovnica 5]}$$

Tieto modelové rovnice by sa však mali používať opatrne, najmä ak počas testu dôjde k zmenám v biodostupnosti testovanej látky (42).

Alternatívne možno pomocou uvedených modelových rovníc vypočítať aj kinetické parametre (k_s a k_e) v jednom teste s použitím modelu kinetiky prvého rádu na všetky údaje z vychytávacej fázy a fázy eliminácie dohromady. Opis metódy, ktorá umožňuje tento kombinovaný výpočet rýchlostných konštánt vychytávania a eliminácie, možno nájsť v odkazoch (55), (56) a (57).

Neeliminované rezíduá (NER) sa majú vypočítať ako sekundárny sledovaný parameter vynásobením pomeru priemernej koncentrácie v červoch (C_a) v 10. deň fázy eliminácie a priemernej koncentrácie v červoch (C_a) v ustálenom stave (28. deň vychytávacej fázy) číslom 100:

$$\boldsymbol{NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{na konci eliminácie}(\text{priemer}) \times 100}{C_a \text{pri ustálenom stave}(\text{priemer})}}$$

▼M6

Dodatok 3

Príklad harmonogramu odberov vzoriek počas 28-dňového testu bioakumulácie

a) **Vychytávacia fáza (vrátane štvordňovej fázy dosahovania rovnováhy)**

Deň	Činnosti
– 6.	Príprava rašelinovej suspenzie pre sediment, uvedenie suspenzie do podmienok na 48 hod.
– 4.	Obohatenie sedimentu alebo frakcie sedimentu, zmiešanie všetkých zložiek sedimentu, odobratie vzoriek sedimentu s aplikovanou látkou a kontrolného sedimentu s rozpúšťadlom na stanovenie koncentrácie testovanej látky, pridanie nadložnej vody, inkubácia v testovacích podmienkach (fáza dosahovania rovnováhy)
– 3./– 2.	Oddelenie testovacích organizmov z kultúry na účely aklimatizácie
0.	Meranie kvality vody (pozri bod 52), odobratie replikátov na účely odberu vzoriek vody a sedimentu na stanovenie koncentrácie testovanej látky, náhodné rozdelenie červov do skúšobných komôr, zachovanie dostatočného počtu podvzoriek červov na stanovenie analytických hodnôt v pozadí, kontrola prívodu vzduchu, ak sa použije uzavretý systém
1.	Odobratie replikátov na účely odberu vzoriek, kontrola prívodu vzduchu, správania červov, kvality vody (pozri bod 56), odobratie vzoriek vody, sedimentu a červov na stanovenie koncentrácie testovanej látky
2.	Kontrola prívodu vzduchu, správania červov a teploty
3.	Rovnaké ako v 1. deň
4. – 6.	Rovnaké ako v 2. deň
7.	Rovnaké ako v 1. deň, kompenzácia odparenej vody, ak je to potrebné
8. – 13.	Rovnaké ako v 2. deň
14.	Rovnaké ako v 1. deň, kompenzácia odparenej vody, ak je to potrebné
15. – 20.	Rovnaké ako v 2. deň
21.	Rovnaké ako v 1. deň, kompenzácia odparenej vody, ak je to potrebné
22. – 27.	Rovnaké ako v 2. deň
28.	Rovnaké ako v 1. deň, meranie kvality vody (pozri bod 52), koniec vychytávacej fázy, zachovanie dostatočného počtu podvzoriek červov na stanovenie analytických hodnôt v pozadí, mokrej a suchej hmotnosti a obsahu lipidov, prenos červov zo zvyšných exponovaných replikátov do nádob obsahujúcich čistý sediment na účely fázy eliminácie (bez vyprázdnenia čriev), odobratie vzoriek vody, sedimentu a červov z kontrolných skupín s rozpúšťadlom, odobratie vzoriek zachytávacích roztokov, ak sa používajú.
	Činnosti pred expozíciou (fáza dosahovania rovnováhy) by sa mali naplánovať s ohľadom na vlastnosti testovanej látky. Ak je to potrebné, uvedenie pripraveného sedimentu pod nadložnou vodou do podmienok pri teplote 20 ± 2 °C počas siedmich dní – v takom prípade skoršia príprava sedimentu!
	Činnosti opísané pre 2. deň by sa mali vykonávať denne (aspoň cez pracovné dni).

▼**M6**

b) **Fáza eliminácie**

Deň	Činnosti
– 6.	Príprava rašelinovej suspenzie pre sediment, uvedenie suspenzie do podmienok na 48 hod.
– 4.	Zmiešanie všetkých zložiek sedimentu, odobratie vzoriek sedimentu s aplikovanou látkou a kontrolného sedimentu s rozpúšťadlom na stanovenie koncentrácie testovanej látky, pridanie nadložnej vody, inkubácia v testovacích podmienkach
0. (28. deň vychytávacej fázy)	Meranie kvality vody (pozri bod 52), prenos červov zo zvyšných exponovaných replikátov do nádob obsahujúcich čistý sediment, po **4 – 6 hod.** odobratie replikátov na účely odberu vzoriek vody, sedimentu a červov na stanovenie koncentrácie testovanej látky, náhodné rozdelenie červov do skúšobných komôr,
1.	Odobratie replikátov na účely odberu vzoriek, kontrola prívodu vzduchu, správania červov, kvality vody (pozri bod 52), odobratie vzoriek vody, sedimentu a červov na stanovenie koncentrácie testovanej látky
2.	Kontrola prívodu vzduchu, správania červov a teploty
3.	Rovnaké ako v 1. deň
4.	Rovnaké ako v 2. deň
5.	Rovnaké ako v 1. deň
6.	Rovnaké ako v 2. deň
7.	Rovnaké ako v 1. deň, kompenzácia odparenej vody, ak je to potrebné
8. – 9.	Rovnaké ako v 2. deň
10.	Rovnaké ako v 1. deň, koniec fázy eliminácie, meranie kvality vody (pozri bod 52), odobratie vzoriek vody, sedimentu a červov z kontrolných skupín s rozpúšťadlom, odobratie vzoriek zachytávacích roztokov, ak sa používajú.
	Príprava sedimentu pred začiatkom fázy eliminácie by mala byť rovnaká ako pred vychytávacou fázou.
	Činnosti opísané pre 2. deň by sa mali vykonávať denne (aspoň cez pracovné dni).

▼**M6**

Dodatok 4

Niektoré fyzikálno-chemické charakteristiky prijateľnej riediacej vody

ZLOŽKA	KONCENTRÁCIE
Tuhé častice	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 µg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Zostatkový chlór	< 10 µg/l
Celkové organofosfátové pesticídy	< 50 ng/l
Celkové organochlórové pesticídy a polychlórované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlór	< 25 ng/l

ZLOŽENIE ODPORÚČANEJ REKONŠTITUOVANEJ VODY

a) Roztok chloridu vápenatého

Rozpustite 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ v deionizovanej vode, doplňte deionizovanou vodou do 1 l.

b) Roztok síranu horečnatého

Rozpustite 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ v deionizovanej vode, doplňte deionizovanou vodou do 1 l.

c) Roztok hydrogénuhličitanu sodného

Rozpustite 2,59 g $NaHCO_3$ v deionizovanej vode, doplňte deionizovanou vodou do 1 l.

d) Roztok chloridu draselného

Rozpustite 0,23 g KCl v deionizovanej vode, doplňte deionizovanou vodou do 1 l.

Všetky chemikálie musia byť analytickej čistoty.

Vodivosť destilovanej alebo deionizovanej vody by nemala presiahnuť 10 μScm^{-1}.

25 ml každého z roztokov a) až d) sa zmieša a celkový objem doplní deionizovanou vodou na 1 l. Súčet iónov vápnika a horčíka v tomto roztoku je 2,5 mmol/l

Pomer iónov Ca: Mg je 4: 1 a pomer iónov Na: K je 10: 1. Kyselinová kapacita $K_{S4.3}$ tohto roztoku je 0,8 mmol/l.

Prevzdušňujte riediacu vodu, kým sa nenasýti kyslíkom, potom ju pred použitím približne na dva dni uskladnite bez ďalšieho prevzdušňovania.

Hodnota pH prijateľnej riediacej vody by mala byť v rozmedzí 6 – 9.

▼M6

Dodatok 5

Umelý sediment – odporúčania na prípravu a skladovanie

Na rozdiel od požiadaviek v testovacej metóde C.8 (40) sa odporúča, aby obsah rašeliny v umelom sedimente bol 2 % namiesto 10 % suchej hmotnosti, aby to zodpovedalo nízkemu až stredne vysokému obsahu organických látok v prírodných sedimentoch (58).

Percento suchých zložiek umelého sedimentu:

Zložka	Charakteristika	% suchého sedimentu
Rašelina	Rašelinníková rašelina, stupeň rozkladu: „stredný“, sušená na vzduchu, bez viditeľných rastlinných zvyškov, jemne mletá (veľkosť častíc ≤ 0,5 mm)	2 + 0,5
Kremenný piesok	Veľkosť zrniek: ≤ 2 mm, ale > 50 % častíc by malo mať veľkosť v rozsahu 50 – 200 μm	76
Kaolín	Obsah kaolinitu ≥ 30 %	22 + 1
Zdroj potravy	*Folia urticae*, listy *Urtica spp.* (pŕhľava) rozomleté na jemný prášok (veľkosť častíc ≤ 0,5 mm) alebo zmes rozomletých listov *Urtica spp.* s alfa-celulózou (1: 1); v súlade s farmaceutickými normami pre ľudskú spotrebu, pridané do suchého sedimentu	0,4 – 0,5 %
Uhličitan vápenatý	$CaCO_3$, práškový, chemicky čistý, pridaný do suchého sedimentu	0,05 – 1
Deionizovaná voda	Vodivosť ≤ 10 μS/cm, pridaná do suchého sedimentu	30 – 50

Ak sa predpokladá zvýšená koncentrácia amoniaku, napr. ak je známe, že testovaná látka inhibuje nitrifikáciu, môže byť užitočné nahradiť 50 % prášku zo žihľavy bohatého na dusík celulózou (napr. α-celulóza v prášku, chemicky čistá, veľkosť častíc ≤ 0,5 mm).

Príprava

Rašelina sa usuší na vzduchu a rozomelie na jemný prášok (veľkosť zrna ≤ 0,5 mm, bez viditeľných rastlinných zvyškov). Pomocou vysokovýkonného homogenizačného zariadenia sa pripraví suspenzia požadovaného množstva rašelinového prášku s použitím časti deionizovanej vody, ktorá sa má pridať do suchého sedimentu [objem vody 11,5 × suchá hmotnosť rašeliny je vhodný na vytvorenie miešateľnej rašelinovej kaše (8)].

Hodnota pH tejto suspenzie sa upraví na 5,5 ± 0,5 pomocou $CaCO_3$. Suspenzia sa aspoň na dva dni uvedie do podmienok jemným premiešavaním pri teplote 20 ± 2 °C, aby sa stabilizovalo pH a vytvorila stabilná mikrobiálna zložka. Znova sa odmeria pH a podľa potreby sa pomocou $CaCO_3$ upraví na 6,0 ± 0,5. Potom sa celá suspenzia zmieša s ostatnými suchými zložkami, pričom sa zohľadní prípadná časť použitá na obohatenie. Pridá sa zvyšná deionizovaná voda, aby sa získal homogénny sediment. Znova sa odmeria pH a podľa potreby sa pomocou $CaCO_3$ upraví na 6,5 až 7,5. Ak sa však očakáva tvorba amoniaku, môže byť užitočné udržiavať pH sedimentu nižšie ako 7,0 (napr. medzi 6,0 a 6,5). Odoberú sa vzorky sedimentu, aby sa určila suchá hmotnosť a obsah organického uhlíka. Ak sa očakáva tvorba amoniaku, umelý sediment sa môže predtým, ako sa obohatí o testovanú látku, sedem dní uvádzať do podmienok, aké sa použijú v nasledujúcom teste (napr. pomer sediment – voda 1: 4, výška vrstvy sedimentu ako v testovacích nádobách), t. j. mal by sa prekryť vodou, ktorá by sa mala prevzdušňovať. Na konci obdobia uvádzania do podmienok je nutné odstrániť a zlikvidovať nadložnú vodu. Odoberú sa vzorky sedimentu, aby sa určila suchá hmotnosť a celkový obsah organického uhlíka (napr. tri vzorky).

▼M6

Potom sa obohatený kremenný piesok zmieša so sedimentom pre každú koncentráciu testovanej látky, sediment sa rozdelí do replikačných testovacích nádob a prekryje testovacou vodou (napr. pomer sediment – voda 1: 4, výška vrstvy sedimentu ako v testovacích nádobách). Nádoby sa potom inkubujú za rovnakých podmienok, aké sa použijú v nasledujúcom teste. V tomto bode sa začína obdobie dosahovania rovnováhy. Nadložnú vodu je potrebné prevzdušňovať.

Zvolený zdroj potravy by sa mal pridať pred obohatením sedimentu testovanou látkou alebo počas neho. Najskôr ho možno zmiešať s rašelinovou suspenziou (pozri vyššie). Nadmernej degradácii zdroja potravy pred pridaním testovacích organizmov – napr. v prípade dlhého obdobia dosahovania rovnováhy – však možno predísť tým, že obdobie medzi pridaním potravy a začiatkom expozície bude čo najkratšie. S cieľom zabezpečiť, aby potrava bola v dostatočnom kontakte s testovanou látkou, by sa zdroj potravy mal zmiešať so sedimentom najneskôr v deň, keď sa testovaná látka pridá do sedimentu. Výnimkou môže byť prípad, keď dĺžka obdobia dosahovania rovnováhy vedie k nadmernej mikrobiálnej degradácii potravy pred pridaním testovacích organizmov. Odoberú sa vzorky sedimentu na stanovenie suchej hmotnosti a celkového obsahu organického uhlíka (napr. tri vzorky obohateného alebo kontrolného sedimentu).

Suchá hmotnosť zložiek (rašelina, piesok, kaolín) by sa mala uvádzať v g a percentách celkovej suchej hmotnosti.

Objem vody, ktorá sa pri príprave sedimentu pridáva do suchých zložiek, by sa mal uviesť aj v percente celkovej suchej hmotnosti (napr. 100 % suchej hmotnosti + 46 % vody znamená, že na 1 000 g suchej hmotnosti sa pridá celkovo 460 ml vody a vznikne 1 460 g mokrého sedimentu).

Skladovanie

Suché zložky umelého sedimentu sa môžu skladovať na suchom a chladnom mieste pri izbovej teplote. Pripravený mokrý sediment možno skladovať (len na ďalšie použitie v kultúre) pri teplote 4 ± 2 °C v tme počas dvoch až štyroch týždňov odo dňa prípravy (8).

Sediment obohatený o testovanú látku by sa mal ihneď použiť, pokiaľ nie sú k dispozícii informácie, že konkrétny sediment možno skladovať bez toho, aby to malo vplyv na toxicitu a biodostupnosť testovanej látky. Vzorky obohateného sedimentu sa môžu až do analýzy skladovať v podmienkach odporúčaných pre konkrétnu testovanú látku.

▼M6

Dodatok 6

Odporúčané druhy máloštetinavcov na testovanie bioakumulácie

Tubifex tubifex* (MÜLLER), *Tubificidae*, *Oligochaeta

Máloštetinavec *Tubifex tubifex* (Müller) z čeľade *Tubificidae* (*Oligochaeta*) žije v sedimentoch sladkých vôd v trubiciach vystlaných hlienom. Červy žijú v týchto trubiciach hlavou nadol a požierajú častice sedimentu, pričom sa živia v ňom žijúcimi mikroorganizmami a organickým odpadom. Zadná časť sa zvyčajne vlní v nadložnej vode, čo umožňuje červovi dýchať. Hoci druh *Tubifex tubifex* žije v širokej škále rôznych druhov sedimentov na celej severnej pologuli, uprednostňuje pomerne jemné častice (59). Vhodnosť tohto druhu na ekotoxikologické testovanie je opísaná napríklad v odkazoch (8) (29) (31) (39) (60) (62) (63).

Metódy kultivácie

Na to, aby sa získal dostatočný počet červov *Tubifex tubifex* na vykonanie testov bioakumulácie, sa červy musia chovať v stálej laboratórnej kultúre. Na kultiváciu červov *T. tubifex* sa odporúča použiť systém zložený z umelého sedimentu založeného na umelo pripravenej pôde podľa testovacej metódy C.8 (40) a z rekonštituovanej vody podľa testovacej metódy C.1 (8).

Ako kultivačné nádoby možno použiť nádoby zo skla alebo z nehrdzavejúcej ocele s výškou 12 – 20 cm. Do každej kultivačnej nádoby sa pridá vrstva mokrého umelého sedimentu pripravená podľa opisu v dodatku 5. Hĺbka vrstvy sedimentu by mala umožniť prirodzené zahrabávanie červov (minimálna hĺbka 2 cm pre *T. tubifex*). Do systému sa pridá rekonštituovaná voda. Treba dbať na to, aby sa minimalizovalo narušenie sedimentu. Voda sa jemne prevzdušňuje (napr. dve bubliny za sekundu pomocou vzduchu filtrovaného 0,45 μm filtrom) s použitím Pasteurovej pipety umiestnenej 2 cm nad povrchom sedimentu. Odporúčaná teplota kultúry je 20 ± 2 °C.

Červy sa pridávajú do kultivačného systému s maximálnou násadou 20 000 jedincov/m^2 povrchu sedimentu. Väčšia násada môže spôsobiť zníženie rýchlosti rastu a rozmnožovania (43).

V kultúrach s umelým sedimentom sa červy musia kŕmiť. Ako doplnkovú výživu možno použiť jemne mletú potravu pre ryby, napr. TetraMin® (8), Klerks 1994, osobná komunikácia. Množstvo potravy by malo umožňovať dostatočný rast a rozmnožovanie a malo by udržať hromadenie amoniaku a rast plesní v kultúre na minime. Potravu možno podávať dvakrát týždenne (napr. 0,6 – 0,8 mg/cm^2 povrchu sedimentu). Z praktických skúseností vyplynulo, že aplikovanie potravy suspendovanej a homogenizovanej v deionizovanej vode môže uľahčiť homogénnu distribúciu potravy na povrchu sedimentu v kultivačných nádobách.

Nadložná voda by sa mala vymieňať pomocou prietokového systému alebo ručne aspoň raz za týždeň, aby sa zabránilo hromadeniu amoniaku. Sediment v zásobných kultúrach by sa mal meniť každé tri mesiace.

Ak sú potrebné len dospelé jedince, vzorky červov možno odobrať z kultúry preosiatím kultivačného sedimentu cez sito s veľkosťou oka 1 mm. Na zachytenie zámotkov je vhodné sito s veľkosťou oka 0,5 mm a na zachytenie mladých červov sito s veľkosťou oka 0,25 mm. Po preosiatí sedimentu možno sitá umiestniť do rekonštituovanej vody. Keď červy opustia sito, možno ich vybrať z vody mäkkou oceľovou pinzetou alebo pipetou s hranami leštenými plameňom.

▼M6

V teste alebo na založenie nových kultúr možno použiť iba neporušené a jasne identifikované jedince *Tubifex tubifex* [napr. (64)]. Choré alebo poranené červy a zámotky zamorené hubovými vláknami sa musia odstrániť.

Synchronizovaná kultúra môže byť podľa potreby zdrojom červov určitého veku vo vhodných intervaloch. Nové kultivačné nádoby sa zakladajú vo zvolených intervaloch (napr. každé dva týždne) so živočíchmi určitého veku (napr. so zámotkami). V kultivačných podmienkach, ktoré sú tu opísané, dosiahnu červy dospelosť po ôsmich až desiatich týždňoch. Červy možno odobrať z kultúry, keď nakládli nové zámotky, napr. po desiatich týždňoch. Vzorky dospelých jedincov možno použiť v teste a so zámotkami možno založiť nové kultúry.

Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), *Lumbriculidae*, *Oligochaeta

Lumbriculus variegatus (*Lumbriculidae*, *Oligochaeta*) takisto žije v sladkovodných sedimentoch na celom svete a často sa používa v ekotoxikologickom testovaní. Informácie o biológii, kultivačných podmienkach a citlivosti druhu možno nájsť v odkazoch (1) (6) (9) (36). Červa *Lumbriculus variegatus* možno s určitými obmedzeniami kultivovať aj v umelom sedimente odporúčanom pre druh *T. tubifex* podľa odkazu (8). Keďže druh *L. variegatus* v prírode uprednostňuje hrubšie sedimenty ako *T. tubifex* (59), laboratórne kultúry s umelým sedimentom používané pre *T. tubifex* môžu po štyroch až šiestich mesiacoch zaniknúť. Z praktických skúseností vyplýva, že druh *L. variegatus* možno niekoľko rokov chovať v pieskovom substráte (napr. kremenný piesok, jemný štrk) v prietokovom systéme s použitím potravy pre ryby ako zdroja výživy bez nutnosti obnovovať substrát. Hlavnou výhodou druhu *L. variegatus* oproti iným druhom vodných máloštetinavcov je jeho rýchle rozmnožovanie, ktoré vedie k rýchlo sa zväčšujúcej biomase v laboratórne kultivovaných populáciách (1) (6) (9) (10).

Metódy kultivácie

Kultivačné podmienky pre druh *Lumbriculus variegatus* sú podrobne opísané v publikáciách Phipps a kol., (1993) (10), Brunson a kol. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (6). Ďalej je uvedené stručné zhrnutie týchto podmienok.

Červy možno chovať vo veľkých akváriách (57 – 80 l) pri teplote 23 °C s fotoperiódou 16 hod. svetla: 8 hod. tmy (100 – 1 000 luxov) s použitím denne obnovovanej prírodnej vody (45 – 50 l na akvárium). Substrát sa pripraví tak, že nebielené hnedé papierové servítky sa narežú na pásy, ktoré potom možno na niekoľko sekúnd ponoriť do kultivačnej vody, čím vzniknú malé kúsky papierového substrátu. Týmto substrátom potom možno priamo pokryť dno kultivačných akvárií pre *Lumbriculus* alebo ho možno uskladniť zmrazený v deionizovanej vode na neskoršie použitie. Nový substrát vydrží v nádrži vo všeobecnosti približne dva mesiace.

Každá kultúra červov sa zakladá s 500 – 1 000 červami, ktoré sa kŕmia 10 ml suspenzie obsahujúcej 6 g štartovacej potravy pre pstruhy trikrát týždenne v podmienkach obnovovania alebo prietoku. V statických alebo semistatických kultúrach by sa červy mali kŕmiť menej, aby sa zabránilo rastu baktérií a plesní. Potrava a papierový substrát by sa mali analyzovať z hľadiska látok, ktoré sa majú použiť v testoch bioakumulácie.

Za týchto podmienok sa počet jedincov v kultúre väčšinou zdvojnásobí približne za 10 až 14 dní.

Červy *Lumbriculus variegatus* možno odobrať z kultúr napr. prenesením substrátu v sieti s jemnými okami alebo prenesením organizmov sklenenou pipetou so širokým otvorom (s priemerom približne 5 mm) leštenej plameňom do samostatnej kadičky. Ak sa do tejto kadičky prenáša aj substrát, kadička

▼M6

s červami a substrátom sa cez noc nechá v podmienkach prietoku. Tým sa z nej odstráni substrát, zatiaľ čo červy zostanú na dne nádoby. Potom ich možno znova vložiť do nových pripravených kultivačných nádrží alebo ďalej spracovať na účely testu podľa opisu v odkazoch (1) a (6). Je potrebné zabrániť zraneniam alebo autotómii červov, napr. tak, že pri manipulácii s nimi sa budú používať pipety s hranami leštenými plameňom alebo špendlíky z nehrdzavejúcej ocele.

Otázka, ktorou sa treba kriticky zaoberať v prípade použitia červov *L. variegatus* v testoch bioakumulácie zo sedimentu, je ich spôsob rozmnožovania (architómia nasledovaná morfalaxiou). Toto nepohlavné rozmnožovanie vedie k vzniku dvoch fragmentov, ktoré sa počas určitého obdobia nekŕmia, až kým sa neregeneruje hlavová alebo chvostová časť [napr. (36) (37)]. To znamená, že v prípade *L. variegatus* absorpcia sedimentu a kontaminujúcej látky požitím nemusí prebiehať nepretržite ako pri čeľadi *Tubificidae*, ktorej zástupcovia sa nerozmnožujú fragmentáciou.

Preto by sa mala vykonať synchronizácia, aby sa minimalizovalo nekontrolované rozmnožovanie a regenerácia, a tým aj veľké rozdiely vo výsledkoch testu. Tieto rozdiely môžu vzniknúť, keď sú niektoré jedince, ktoré sa fragmentovali, a teda sa určitý čas nekŕmia, menej vystavené testovanej látke ako ostatné jedince, ktoré sa počas testu nefragmentovali, napr. (38). Červy by sa mali 10 – 14 dní pred začiatkom expozície umelo fragmentovať (synchronizácia) (65). Mali by sa použiť veľké červy, ktoré podľa možnosti nevykazujú známky nedávnej fragmentácie. Tieto červy možno umiestniť na sklenené podložné sklíčko do kvapky kultivačnej vody a skalpelom rozrezať v strednej časti tela. Treba dbať na to, aby zadné konce boli podobnej veľkosti. Zadné konce by sa potom mali až do začiatku expozície nechať, aby si regenerovali nové hlavy, v kultivačnej nádobe obsahujúcej rovnaký substrát, aký sa používa v kultivačnej vode, a rekonštituovanú vodu. Regenerácia nových hláv prebehla vtedy, keď sa synchronizované červy zahrabávajú do substrátu (prítomnosť regenerovaných hláv možno potvrdiť preskúmaním reprezentatívnej podvzorky pod binokulárnym mikroskopom). Očakáva sa, že testovacie organizmy budú mať podobný fyziologický stav. To znamená, že ak počas testu dôjde pri synchronizovaných červoch k regenerácii morfalaxiou, prakticky všetky živočíchy by mali byť rovnako vystavené obohatenému sedimentu. Synchronizované červy by sa mali nakŕmiť ihneď, ako sa začnú zahrabávať do substrátu, alebo sedem dní po reze. Kŕmny režim by mal byť porovnateľný s bežnými kultúrami a odporúča sa kŕmiť synchronizované červy tým istým zdrojom potravy, aký sa použije v teste. Červy sa majú chovať pri testovacej teplote 20 ± 2 °C. Po regenerácii sa v teste majú použiť neporušené úplné červy podobnej veľkosti, ktoré po jemnom mechanickom podnete aktívne plávajú alebo lezú. Je potrebné zabrániť zraneniam alebo autotómii červov, napr. tak, že pri manipulácii s nimi sa budú používať pipety s hranami leštenými plameňom alebo špendlíky z nehrdzavejúcej ocele.

Pri použití červov *Lumbriculus variegatus* v teste by vzhľadom na osobitný spôsob rozmnožovania tohto druhu malo počas testu za vhodných podmienok dôjsť k zvýšeniu počtu červov (6). Neprítomnosť rozmnožovania v teste bioakumulácie s druhom *L. variegatus* by sa mala zaznamenať a vziať do úvahy pri interpretácii výsledkov testu.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), *Tubificidae*, *Oligochaeta* (nevalidované v kruhovom teste)**

Druh *Branchiura sowerbyi* žije v rôznych druhoch sedimentu vo vodných nádržiach, jazerách, rybníkoch a riekach, pôvodne v tropických oblastiach. Možno ho nájsť aj v útvaroch s teplou vodou na severnej pologuli. Početnejší je však v bahnito-ílových sedimentoch s vysokým obsahom organickej hmoty. Červy okrem toho žijú vo vrstve sedimentu. Dokonca aj zadný koniec červov je zvyčajne zahrabaný. Tento druh sa ľahko identifikuje podľa žiabrových vlákien

▼M6

na zadnej časti. Dospelé jedince môžu dosiahnuť dĺžku 9 – 11 cm a mokrú hmotnosť 40 – 50 mg. Červy majú vysokú rýchlosť rozmnožovania: v podmienkach teploty a kŕmenia uvedených ďalej sa populácia zdvojnásobí za menej ako dva týždne [Aston a kol., 1982, (65)]. Druh *B. sowerbyi* sa použil v štúdiách toxicity i bioakumulácie [Marchese a Brinkhurst 1996, (31), resp. Roghair a kol. 1996, (67)].

Metódy kultivácie

Ďalej sa uvádza zhrnutie kultivačných podmienok pre druh *Branchiura sowerbyi* (poskytli Mercedes R. Marchese, INALI, Argentína a Carla J. Roghair, RIVM, Holandsko).

Nevyžaduje sa žiadna konkrétna metóda kultivácie testovacích organizmov. Organizmy možno kultivovať s použitím nekontaminovaného prírodného sedimentu (31). Z praktických skúseností vyplynulo, že médium zložené z prírodného sedimentu a piesku zlepšuje stav červov v porovnaní s čisto prírodným sedimentom (32) (67). Na kultiváciu možno použiť 3 l kadičky obsahujúce 1 500 ml média zo sedimentu/vody, ktoré sa skladá z 375 ml prírodného nekontaminovaného sedimentu (približne 10 % celkového organického uhlíka, približne 17 % častíc ≤ 63 μm), 375 ml čistého piesku (M32) a 750 ml rekonštituovanej alebo odchlórovanej vody z vodovodu (31) (32) (67). Ako substrát na kultiváciu sa môžu použiť aj papierové servítky, ale rast populácie bude nižší ako v prírodnom sedimente. V semistatických systémoch sa vrstva vody v kadičke pomaly prevzdušňuje a nadložná voda by sa mala obnovovať raz týždenne.

Každá kadička na začiatku obsahuje 25 mladých červov. Po dvoch mesiacoch sa veľké červy vyberú zo sedimentu pinzetou a vložia sa do novej kadičky s čerstvo vyrobeným médiom zo sedimentu/vody. Stará kadička obsahuje aj zámotky a mladé červy. Týmto spôsobom možno z jednej kadičky získať až 400 mladých červov. Dospelé červy možno používať na rozmnožovanie minimálne jeden rok.

Kultúry by sa mali udržiavať pri teplote 21 – 25 °C. Zmeny teploty by nemali prekročiť ± 2 °C. Čas potrebný na embryonálny vývin od nakladenia vajíčok až po okamih, keď mladý jedinec opustí zámotok, je pri teplote 25 °C približne tri týždne. Prežívajúci červ druhu *B. sowerbyi* vytvorí 6,36 (31) až 11,2 (30) vajíčok v bahne pri teplote 25 °C. Počet vajíčok na zámotok je v rozmedzí od 1,8 do 2,8 (66) (69) alebo maximálne 8 (68).

Každý týždeň by sa mal odmerať rozpustený kyslík, tvrdosť vody, teplota a pH. Dvakrát alebo trikrát týždenne možno pridať potravu pre ryby (napr. TetraMin®) ako suspenziu *ad libitum*. Červy možno kŕmiť aj rozmrazeným šalátom *ad libitum*.

Veľkou výhodou tohto druhu je vysoká individuálna biomasa (až 40 – 50 mg mokrej hmotnosti na jedinca). Tento druh preto možno použiť na testovanie bioakumulácie testovaných látok, ktoré nie sú rádioaktívne označené. Expozícia môže prebiehať v systémoch používaných pre druh *T. tubifex* alebo *L. variegatus* s jedným jedincom na replikát (11). V takom prípade by sa však mal zvýšiť počet replikátov, pokiaľ sa nepoužijú väčšie skúšobné komory (11). Pri tomto druhu je potrebné upraviť aj kritérium validity týkajúce sa zahrabávania.

▼**M6**

LITERATÚRA

1. ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. V ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

2. Európska komisia (EK) (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. Úrad pre vydávanie úradných publikácií Európskych spoločenstiev, Luxemburg.

3. OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organizácia pre hospodársku spoluprácu a rozvoj (OECD), Paríž.

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. a 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. Kapitola C.13 tejto prílohy, biokoncentrácia: prietokový rybí test.

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, marec 2000.

7. Kapitola C.27 tejto prílohy, test toxicity *Chironomidae* v systéme sediment – voda za použitia obohateného sedimentu

8. Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. a 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. a 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. a 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. a Studinger, G. (1999). Workshop on „Bioaccumulation: Sediment test using benthic *oligochaetes*“, 26. – 27.4.1999, Hochheim/Main, Nemecko. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlín.

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. a 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. V: R. Nagel a R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlín 1990. VCH, Weinheim.

15. Landrum, P.F., Lee II, H. a 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. a Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by *oligochaetes*. Wat. Res. 23, 1443 – 1450.

17. Gabric, A.J., Connell, D.W. a Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by *oligochaetes*. Wat. Res. 24, 1225 – 1231.

18. Kukkonen, J. a 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. a 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. Kapitoly tejto prílohy:

Kapitola A.4, tlak pary

Kapitola A.5, povrchové napätie

Kapitola A.6, rozpustnosť vo vode

Kapitola A.8, rozdeľovacia konštanta, metóda trepačkovej banky

Kapitola A.24, rozdeľovacia konštanta, metóda HPLC

Kapitola C.7, degradácia — abiotická degradácia: hadrolýza ako funkcia pH

Kapitola C.4 A – F Stanovenie ľahkej biodegradovateľnosti

Kapitola C.19, odhad adsorpčného koeficientu (KOC) na pôde a kale z odpadových vôd pomocou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC).

Kapitola C.29, ľahká biodegradovateľnosť CO2 v hermeticky uzavretých nádobách

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, Paríž.

24. Antoine, M.D., Dewanathan, S. a 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 a G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. V 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. 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. a 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. a 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. a Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid *oligochaete* worm *Tubifex tubifex*. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1061 – 1072.

30. Aston, R.J. a 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. a 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. a 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. Kapitola C.1 tejto prílohy, ryby, test akútnej toxicity.

34. OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paríž.

35. Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. a Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. Hydrobiologia 11, 181 – 184.

36. Leppänen, M.T. a 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. a 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. a 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. a 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. Kapitola C.8 tejto prílohy, Toxicita pre dážďovky.

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*). V: R.O. Brinkhurst a 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. a 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. a 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. a 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. a Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography, 30, 1099 – 1105.

50. Bligh, E.G. a 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. a 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, Dánsko.

53. Zok, S., Görge, G., Kalsch, W. a 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, Nemecko.

55. Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries a 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. a 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. a 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. a 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. 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. 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. a Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. V: A. Mudroch, J.M. Azcue a 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. a 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. a 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. a Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (*Oligochaeta*, *Tubificidae*). Hydrobiologia, 278, 267 – 274.

▼M7

C.47. TEST TOXICITY V RANOM ŠTÁDIU VÝVOJA RÝB

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 210 (2013). Účelom testov v ranom štádiu vývoja rýb je určiť letálne a subletálne účinky chemikálií na testované štádiá a druhy. Poskytujú hodnotné informácie pre odhad chronických letálnych a subletálnych účinkov chemikálie na ďalšie druhy rýb.

2. Usmernenie na vykonávanie testov 210 vychádza z návrhu Spojeného kráľovstva, o ktorom sa rokovalo na stretnutí expertov OECD, ktoré sa konalo v Medmenhame (Spojené kráľovstvo) v novembri 1988, a ktorý bol ďalej aktualizovaný v roku 2013, aby sa v ňom zohľadnili skúsenosti z používania testu a odporúčania z pracovného seminára OECD o testovaní toxicity na rybách, ktorý sa konal v septembri 2010 (1).

PRINCÍP TESTU

3. Rané štádiá vývoja rýb sú vystavené sérii koncentrácií testovanej chemikálie rozpustenej vo vode. Uprednostňujú sa prietokové podmienky, ak to však nie je možné, sú prijateľné aj semistatické podmienky. Pokiaľ ide o podrobnosti, treba sa riadiť pokynmi OECD o testovaní toxicity zložitých látok a zmesí vo vodnom prostredí (2). Test sa začne umiestnením oplodnených vajíčok do testovacích komôr a pokračuje sa v ňom počas časového úseku špecifického pre jednotlivé druhy, ktorý je potrebný na to, aby kontrolné ryby dosiahli vývojové štádium mlade. Posúdením letálnych a subletálnych účinkov a ich porovnaním s kontrolnými hodnotami sa určí najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC) s cieľom určiť i) koncentráciu bez pozorovaného účinku (NOEC) a/alebo ii) hodnotu EC_x (napr. EC_{10}, EC_{20}), a to použitím regresného modelu na odhadnutie koncentrácie, ktorá by spôsobila x % zmenu v meranom účinku. Uvedenie príslušných účinných koncentrácií a parametrov môže závisieť od regulačného rámca. Testovacie koncentrácie by mali zahŕňať hodnotu EC_x, aby hodnota EC_x vychádzala z interpolácie, a nie z extrapolácie (definície nájdete v dodatku 1).

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

4. Testovaná chemikália je to, čo sa testuje. Jej rozpustnosť vo vode (pozri kapitolu A.6 tejto prílohy) a tlak pár (pozri kapitolu A.4 tejto prílohy) by mali byť známe a mala by byť dostupná spoľahlivá analytická metóda na stanovenie množstva chemikálie v testovacom roztoku so známou a udanou presnosťou a kvantifikačným limitom. Výsledky testu akútnej toxicity (pozri kapitolu C.1 alebo C.49 tejto prílohy), pokiaľ možno vykonaného s druhom vybraným pre tento test, môžu poskytnúť užitočné informácie, hoci jeho vykonanie sa nepožaduje.

5. Ak sa daná testovacia metóda použije na testovanie zmesi, jej zloženie by malo byť čo najviac charakterizované, napr. chemickou identitou jej zložiek, ich kvantitatívnym výskytom a vlastnosťami jednotlivých látok (ako sú vlastnosti uvedené vyššie). Pred použitím testovacej metódy na regulačné testovanie zmesi by sa malo posúdiť, či poskytne prijateľné výsledky z hľadiska zamýšľaného regulačného účelu.

6. Užitočné informácie zahŕňajú štruktúrny vzorec, čistotu látky, rozpustnosť vo vode, stabilitu vo vode a na svetle, pK_a, P_{ow} a výsledky testu na ľahkú biologickú odbúrateľnosť (napr. kapitoly C.4 alebo C.29 tejto prílohy).

▼M7

PLATNOSŤ TESTU

7. Ak má byť test platný, musia byť splnené tieto podmienky:

— koncentrácia rozpusteného kyslíka by mala počas testu dosahovať > 60 % hodnoty saturácie vzduchom,

— teplota vody by sa medzi testovacími komorami alebo medzi za sebou nasledujúcimi dňami v žiadnom okamihu počas testu nemala líšiť o viac ako ± 1,5 °C a mala by byť v rozsahu teplôt určených pre testované druhy (dodatok 2),

— analytické meranie testovacích koncentrácií je povinné,

— počet všetkých oplodnených vajíčok, ktoré prežili, a počet vyliahnutých lariev, ktoré prežili, v kontrolných skupinách, prípadne v kontrolných skupinách s rozpúšťadlom, by mal byť väčší alebo rovnaký ako limity stanovené v dodatku 2.

8. Ak sa zistí mierna odchýlka od kritérií platnosti, dôsledky by sa mali posudzovať s ohľadom na spoľahlivosť testovacích údajov a tieto úvahy by mali byť zahrnuté do správy. Mali by sa oznamovať účinky na prežitie, liahnutie alebo rast, ku ktorým dochádza v kontrolnej skupine s rozpúšťadlom, v porovnaní s negatívnou kontrolnou skupinou, a malo by sa o nich diskutovať v súvislosti so spoľahlivosťou testovacích údajov.

OPIS METÓDY

Testovacie komory

9. Možno použiť akékoľvek nádoby zo skla, nehrdzavejúcej ocele alebo iné chemicky inertné nádoby. Keďže je známe, že silikón má silnú schopnosť absorbovať lipofilné látky, používanie silikónových rúrok v prietokových štúdiách a používanie silikónových tesnení v kontakte s vodou by sa malo minimalizovať používaním napr. monoblokových sklenených akvárií. Rozmery nádob by mali byť dostatočne veľké na to, aby umožňovali náležitý rast v kontrolnej skupine, udržiavanie koncentrácie rozpusteného kyslíka (napr. pri malých druhoch rýb sa to dosiahne nádržou s objemom 7 l) a dodržanie kritéria veľkosti násady uvádzaného v bode 19. Žiaduce je, aby bolo umiestnenie skúšobných komôr na testovacej ploche náhodné. Náhodný blokový návrh, v ktorom sa v každom bloku nachádza každá skupina s aplikovanou chemikáliou, sa uprednostňuje pred úplne náhodným dizajnom. Testovacie komory by sa mali chrániť pred nežiaducim rušením. Testovací systém by mal byť kondiciovaný koncentráciami testovanej chemikálie dostatočne dlho, aby sa prejavili stabilné expozičné koncentrácie ešte pred vložením testovaných organizmov.

Výber druhov

10. Odporúčané druhy rýb sú uvedené v tabuľke 1. Týmto sa nevylučuje použite iných druhov, postup testovania však môže byť potrebné upraviť tak, aby sa dosiahli vhodné testovacie podmienky. V tom prípade treba uviesť dôvody, ktoré viedli k výberu iných druhov, a experimentálnu metódu.

Chov generačných rýb

11. Podrobnosti o chove generačných rýb za uspokojivých podmienok možno nájsť v dodatku 3 a citovaných odkazoch (3)(4)(5).

Manipulácia s oplodnenými vajíčkami, embryami a larvami

12. Na začiatku možno oplodnené vajíčka, embryá a larvy vystaviť chemikálii v rámci hlavnej nádoby, a to v menších sklenených nádobách alebo nádobách z nehrdzavejúcej ocele vybavených sieťovinovými stenami alebo koncami, aby sa umožnilo pretekanie testovacieho roztoku cez nádobu.

▼M7

Neturbulentný tok cez tieto malé nádoby možno zabezpečiť ich zavesením na rameno upravené na pohybovanie nádobami nahor a nadol tak, aby organizmy zostali vždy ponorené. Oplodnené vajíčka lososovitých rýb možno umiestniť na inkubačných podložkách alebo sieťkach s dostatočne veľkými okami, aby mohli cez ne larvy po vyliahnutí prepadnúť.

13. Ak boli na držanie vajíčok v hlavnej testovacej nádobe použité inkubačné vložky na vajíčka, mriežky alebo sieťky, tieto držiaky by sa mali po vyliahnutí lariev odstrániť podľa návodu v dodatku 3 okrem prípadov, keď treba sieťky ponechať na zabránenie úniku lariev. Ak treba larvy preniesť, nemali by sa vystaviť vzduchu a nemali by sa používať sieťky na ich vylovenie z inkubačných vložiek. Načasovanie tohto prenosu sa líši v závislosti od druhu a malo by sa zdokumentovať v správe. Prenos však nemusí byť vždy nevyhnutný.

Voda

14. Každú vodu, v ktorej testovaný druh vykazuje vyhovujúco dlhotrvajúce prežívanie a rast, možno použiť na testovanie (pozri dodatok 4). Mala by mať konštantnú kvalitu počas celého trvania testu. S cieľom zaistiť, že voda na riedenie neovplyvní výsledky testu neprimeraným spôsobom (napríklad tvorbou komplexov testovanej chemikálie) alebo že nebude mať nepriaznivý vplyv na reprodukčnú úžitkovosť generačných rýb, mali by sa z nej v pravidelných intervaloch odoberať vzorky na analýzu. Ak je známe, že voda na riedenie má relatívne stálu kvalitu, mal by sa v nej napríklad dvakrát ročne merať obsah ťažkých kovov (napr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavných aniónov a katiónov (napr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), amoniaku, celkového zvyškového chlóru, pesticídov, celkový obsah organického uhlíka a obsah suspendovaných tuhých látok. Ak je známe, že voda má premenlivú kvalitu, merania sa musia vykonávať častejšie, pričom frekvencia závisí od miery premenlivosti kvality. Niektoré chemické vlastnosti pre prijateľnú vodu na riedenie sú uvedené v dodatku 4.

Testovacie roztoky

15. Pri prietokových testoch sa vyžaduje systém, ktorý kontinuálne privádza a riedi zásobný roztok testovanej chemikálie (napr. dávkovacie čerpadlo, proporcionálny zrieďovač, saturačný systém) na prísun série koncentrácií do testovacích komôr. Prietoky zásobných roztokov a vody na riedenie by sa mali kontrolovať v určitých intervaloch počas testu, pričom by sa v priebehu testu nemali meniť o viac ako 10 %. Za vhodný sa považuje prietok zodpovedajúci aspoň piatim objemom testovacej komory za 24 hodín (3). Ak sa však dodrží veľkosť násady stanovená v bode 19, je možný aj nižší prietok napr. 2 – 3 objemy testovacej komory, aby sa zabránilo rýchlemu vymývaniu potravy.

16. Testovacie roztoky vybraných koncentrácií sa pripravujú riedením zásobného roztoku. Zásobný roztok by sa mal podľa možností pripraviť jednoduchým miešaním alebo trepaním testovanej chemikálie vo vode na riedenie mechanickým prostriedkom (napr. miešadlom a/alebo ultrazvukom). Na dosiahnutie vhodne koncentrovaného zásobného roztoku možno použiť saturačné kolóny (rozpúšťacie kolóny) alebo pasívne dávkovacie metódy (6). Použitie rozpúšťadla ako nosiča sa neodporúča. Ak je však rozpúšťadlo potrebné, mala by sa súbežne testovať kontrolná skupina s rozpúšťadlom, a to s rovnakou koncentráciou rozpúšťadla, aká je v skupinách s aplikovanou chemikáliou. t. j. úroveň rozpúšťadla by mala byť podľa možnosti rovnaká pri všetkých koncentráciách, ako aj v kontrolnej skupine s rozpúšťadlom. Pri

▼M7

niektorých riediacich systémoch to môže byť technicky náročné, pričom v takom prípade by mala byť koncentrácia rozpúšťadla v kontrolnej skupine s rozpúšťadlom totožná s najvyššou koncentráciou rozpúšťadla v skupine s aplikovanou chemikáliou. Pri ťažko testovateľných látkach by sa mal konzultovať usmerňovací dokument OECD č. 23 o testovaní toxicity ťažko testovateľných látok a zmesí vo vodnom prostredí (2). Ak sa používa rozpúšťadlo, výber rozpúšťadla bude daný chemickými vlastnosťami látky. V pokynoch OECD č. 23 sa odporúča maximálna koncentrácia 100 µl/l. Aby sa predišlo možnému účinku rozpúšťadla na ukazovatele (7), odporúča sa udržovať čo najnižšiu koncentráciu rozpúšťadla.

17. V prípade semistatického testu možno použiť dva rôzne postupy obnovy. Buď sa nové testovacie roztoky pripravia v čistých nádobách a živé vajíčka a larvy sa opatrne prenesú do nových nádob alebo sa testovacie organizmy nechajú v testovacích nádobách a časť (aspoň dve tretiny) objemu testovacieho roztoku/kontrolného roztoku sa vymení.

POSTUP

Podmienky expozície

Trvanie

18. Test by sa mal začať čo najskôr po oplodnení vajíčok a vajíčka by sa podľa možnosti mali ponoriť do testovacích roztokov pred začatím ryhovania blastodisku, alebo čo najskôr po tomto štádiu. Dĺžka testu bude závisieť od použitých druhov. Niektoré odporúčané dĺžky testu sú uvedené v dodatku 2.

Nasádzanie

19. Počet oplodnených vajíčok na začiatku testu by mal byť dostatočný na to, aby sa splnili štatistické požiadavky. Mali by byť náhodne rozdelené do skupín s aplikovanou chemikáliou a malo by sa použiť najmenej 80 vajíčok rozdelených v rovnakom množstve najmenej do štyroch paralelných testovacích komôr (replikátov) na každú koncentráciu. Veľkosť násady (množstvo biomasy na objem testovacieho roztoku) by mala byť dosť nízka na to, aby sa počas štádia vajíčka a larválneho štádia mohla koncentrácia rozpusteného kyslíka udržiavať na hodnote najmenej 60 % hodnoty saturácie vzduchom bez prevzdušňovania. Pri prietokových testoch sa neodporúča, aby veľkosť násady v ktoromkoľvek okamihu prekročila 0,5 g/l mokrej hmotnosti počas 24 hodín a prekročila 5 g/l roztoku (3).

Svetlo a teplota

20. Fotoperióda a teplota vody by mali byť vhodné pre dané testované druhy (pozri dodatok 2).

Kŕmenie

21. Potrava a kŕmenie zohrávajú rozhodujúcu úlohu a je nevyhnutné, aby sa v každom vývojovom štádiu poskytovala správna potrava od vhodného okamihu a v dostatočnom množstve na podporu normálneho rastu. Kŕmenie by malo byť približne rovnaké vo všetkých replikátoch, pokiaľ ho netreba upraviť z dôvodu úmrtnosti. Nadbytočná potrava a výkaly by sa mali podľa potreby odstrániť, aby sa nehromadil odpad. Podrobné kŕmne režimy sú uvedené v dodatku 3, ale s nadobúdaním skúseností sa potrava a kŕmne režimy priebežne vylepšujú s cieľom zvýšiť prežitie a optimalizovať rast. Živá potrava je zdrojom obohatenia prostredia, a preto by sa mala používať namiesto sušenej alebo mrazenej potravy alebo ako jej doplnok, pokiaľ je to vhodné z hľadiska daného druhu a vývojového štádia.

Testovacie koncentrácie

22. Spravidla sa vyžaduje päť koncentrácií testovanej chemikálie, minimálne so štyrmi opakovaniami (replikátmi) na koncentráciu, s odstupom daným konštantným faktorom nepresahujúcim hodnotu 3,2. Pokiaľ sú dostupné informácie o testovaní akútnej toxicity, podľa možnosti na tom istom druhu, mali by sa zohľadniť pri výbere rozsahu testovacích koncentrácií a/alebo by sa malo zvážiť vykonanie testu na vyhľadávanie rozsahu (1). Pri výbere rozsahu testovacích koncentrácií by sa však mali zohľadniť všetky zdroje

▼M7

informácií vrátane zdrojov, ako je krížové porovnávanie údajov z testovania akútnej toxicity rybích embryí. Tam, kde sa majú stanoviť len empirické NOEC, môže byť ako konečný test prijateľný limitný test alebo rozšírený limitný test s menej ako piatimi koncentráciami. Použije menej ako piatich koncentrácií by sa malo odôvodniť. Koncentrácia testovanej chemikálie vyššia ako 96 hodín LC_{50} alebo 10 mg/l a tá, ktorá z nich je nižšia, nemusí byť testovaná.

Kontroly

23. Jedna kontrolná skupina s vodou na riedenie a podľa potreby jedna kontrolná skupina s rozpúšťadlom obsahujúca len samotné rozpúšťadlo ako nosič by sa mali testovať ako doplnok k sériám koncentrácií testovanej chemikálie (pozri bod 16).

Frekvencia analytických stanovení a meraní

24. Pred spustením expozície by sa bolo treba uistiť, že systém prísunu chemikálie riadne funguje vo všetkých replikátoch (napr. meraním testovacích koncentrácií). Mali by sa určiť požadované analytické metódy vrátane vhodného kvantifikačného limitu (LOQ) a dostatočných znalostí o stabilite látky v testovacom systéme. Počas testu sa koncentrácie testovanej chemikálie stanovujú v pravidelných časových intervaloch s cieľom charakterizovať expozíciu. Potrebných je minimálne päť stanovení. V prietokových systémoch by sa mali aspoň raz za týždeň vykonávať analytické merania testovanej chemikálie v jednom replikáte na koncentráciu so systematickým striedaním replikátov. Ďalšími analytickými stanoveniami sa často zlepší kvalita výsledku testu. Vzorky možno treba filtrovať, aby sa odstránili akékoľvek tuhé častice (napr. použitím filtra s veľkosťou pórov 0,45 μm), alebo odstreďovať, aby sa zaistilo, že sa stanovenia vykonávajú s chemikáliou v skutočnom roztoku. Aby sa znížila adsorpcia testovanej chemikálie, filtre by mali byť pred použitím nasýtené. Keď merané koncentrácie nezostanú na 80 – 120 % nominálnej koncentrácie, účinné koncentrácie by sa mali stanoviť a vyjadriť vo vzťahu k aritmeticky priemernej koncentrácii pre prietokové testy [pozri dodatok 6 testovacej metódy C.20 pre výpočet aritmetického priemeru (8)] a vo vzťahu ku geometrickému priemeru meraných koncentrácií pre semistatické testy [pozri kapitolu 5 v pokynoch OECD o testovaní toxicity zložitých látok a zmesí vo vodnom prostredí (2)].

25. Počas testu by sa mal vo všetkých testovacích nádobách aspoň raz týždenne merať rozpustený kyslík, pH a teplota a na začiatku a konci testu by sa mala odmerať salinita a tvrdosť, ak je to opodstatnené. Teplota by sa mala podľa možnosti monitorovať kontinuálne aspoň v jednej testovacej nádobe.

Pozorovania

26. **Štádium embryonálneho vývoja**: na začiatku vystavenia testovanej chemikálii by sa embryonálne štádium malo čo najpresnejšie overiť. Toto overenie možno vykonať na reprezentatívnej vzorke vajíčok vhodne uchovaných a vyčistených.

27. **Liahnutie a prežitie**: pozorovania liahnutia a prežívania by sa mali vykonávať najmenej raz za deň a údaje by sa mali zaznamenať. Ak sa na vajíčkach v rannom štádiu embryonálneho vývoja spozoruje pleseň (napr. v prvý alebo druhý deň testu), takéto vajíčka by sa mali spočítať a odstrániť. Mŕtve embryá, larvy a mlaď by sa mali odstrániť hneď, ako sa spozorujú, lebo sa môžu rýchlo rozkladať a môže ich narušiť činnosť ostatných rýb. Pri odstraňovaní mŕtvych jedincov treba postupovať mimoriadne opatrne, aby nedošlo k fyzickému poškodeniu susedných vajíčok/lariev. Prejavy úhynu sa líšia podľa druhu a vývojového štádia. Napríklad:

▼M7

— u oplodnených vajíčok: predovšetkým v ranných štádiách, výrazná strata priehľadnosti a zmena v zafarbení spôsobené koaguláciou a/alebo zrážaním proteínov, čo vedie k bielemu nepriehľadnému vzhľadu,

— u embryí, lariev a mladi: nepohyblivosť a/alebo neprítomnosť respiračných pohybov a/alebo neprítomnosť tlkotu srdca a/alebo strata reakcií na mechanické stimuly.

28. **Abnormálny vzhľad**: počet lariev alebo mlade prejavujúcich abnormality v tvare tela by sa mal zaznamenávať v primeraných časových intervaloch v závislosti od dĺžky trvania testu a charakteru opísaných abnormalít. Treba poznamenať, že abnormálne larvy a mlaď sa vyskytujú prirodzene a v kontrolných skupinách sa pri niektorých druhoch môžu vyskytnúť v počte rádovo niekoľko percent. Ak sa deformácie a súvisiace abnormálne správanie považujú za tak vážne, že organizmus značne trpí a dosiahol bod, z ktorého sa už nezotaví, možno ho odstrániť z testu. Takéto zvieratá by sa mali usmrtiť a v rámci následnej analýzy údajov by sa mali považovať za uhynuté jedince. Pri väčšine druhov odporúčaných v tejto testovacej metóde bol zaznamenaný normálny embryonálny vývoj (9) (10) (11) (12).

29. **Abnormálne správanie**: abnormality ako hyperventilácia, nekoordinované plávanie, netypická nehybnosť a netypické správanie pri kŕmení by sa mali zaznamenávať v primeraných časových intervaloch v závislosti od dĺžky trvania testu (napr. raz denne pri teplovodných druhoch). Tieto účinky, hoci ich je ťažké kvantifikovať, môžu (ak sú spozorované) pomôcť pri interpretácii údajov o mortalite.

30. **Hmotnosť**: na konci testu sa všetky živé ryby odvážia aspoň podľa replikátov (s udaním počtu zvierat v replikáte a priemernej hmotnosti na zviera): uprednostňuje sa mokrá hmotnosť (vytreté do sucha), uvádzať však možno aj údaje o suchej hmotnosti (13).

31. **Dĺžka**: na konci testu sa zmeria dĺžka jednotlivých jedincov. Odporúča sa celková dĺžka, ak sa však vyskytne hnitie chvostovej plutvy alebo erózia plutvy, možno použiť štandardnú dĺžku. Na všetky ryby v rámci daného testu by sa mala použiť rovnaká metóda. Dĺžku jednotlivých jedincov možno merať buď napr. posuvným meradlom, digitálnym fotoaparátom, alebo kalibrovaným okulárovým mikrometrom. Typické minimálne dĺžky sú uvedené v dodatku 2.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Spracovanie výsledkov

32. Odporúča sa, aby návrh experimentu a výber štatistického testu poskytovali dostatočnú silu (80 % alebo viac) na detekciu zmien biologického významu v ukazovateľoch, pri ktorých má byť určený NOEC. Uvedenie príslušných účinných koncentrácií a parametrov môže závisieť od regulačného rámca. Ak sa má zaznamenať hodnota EC_x, návrh experimentu a výber regresného modelu by mali umožňovať odhad hodnoty EC_x, aby i) 95 % interval spoľahlivosti uvádzaný pre hodnotu EC_x neobsahoval nulu a nebol príliš široký; ii) 95 % interval spoľahlivosti pre predpokladanú strednú hodnotu pri EC_x neobsahoval strednú hodnotu kontrolnej skupiny; iii) medzi regresným modelom a údajmi nebol významný nesúlad. Pri obidvoch prístupoch sa vyžaduje identifikácia percentuálnej zmeny v každom sledovanom ukazovateli, ktorého zistenie alebo odhad sú dôležité. Návrh experimentu by sa mal prispôsobiť tak, aby to bolo možné. Pokiaľ nie sú uvedené podmienky na stanovenie hodnoty EC_x splnené, mal by sa uplatniť prístup založený na NOEC. Nie je pravdepodobné, že rovnaká percentuálna zmena

▼M7

bude platiť pre všetky ukazovatele, a nie je pravdepodobné ani to, že sa podarí navrhnúť uskutočniteľný experiment, ktorý bude spĺňať tieto kritériá pre všetky ukazovatele, preto je v záujme správneho naplánovania experimentu dôležité zamerať sa na ukazovatele, ktoré sú dôležité pre daný experiment. Štatistické vývojové diagramy a návod ku každému prístupu sú k dispozícii v dodatkoch 5 a 6 na poskytnutie usmernenia pri spracovaní údajov a pri výbere najvhodnejšieho štatistického testu alebo modelu. Možno použiť aj iné štatistické prístupy za predpokladu, že sú vedecky podložené.

33. V každom súbore replikátov bude treba analyzovať variabilitu použitím analýzy rozptylu alebo kontingenčnej tabuľky a na základe tejto analýzy použiť vhodné metódy štatistickej analýzy. Aby bolo možné urobiť viacnásobné porovnanie výsledkov pre jednotlivé koncentrácie a kontroly, odporúča sa step-down Jonckheereho-Terpstrov alebo Williamsov test pre spojité hodnoty a step-down Cochranov-Armitageov test pre diskrétne hodnoty, ktoré zodpovedajú monotónnej koncentračnej závislosti bez extra-binomického rozptylu (14). Ak existuje dôkaz o extrabinomickom rozptyle, odporúča sa Raova-Scottova úprava Cochranovho-Armitageovho testu (15) (16) alebo použitie Wiliamsovho alebo Dunnettovho (po transformácii arkussínusovej odmocniny) alebo Jonckheereho-Terpstrovho testu na jednotlivé replikáty. Ak údaje nezodpovedajú monotónnej koncentračnej závislosti, pre spojité hodnoty môže byť užitočná Dunnettova, Dunnova alebo Mannova-Whitneyho metóda a pre diskrétne hodnoty Fisherov exaktný test (14) (17) (18). Pri použití akejkoľvek štatistickej metódy alebo modelu treba postupovať opatrne, aby sa zaistilo splnenie požiadaviek metódy alebo modelu (napr. odhadne sa variabilita medzi komorami a zohľadní sa pri navrhovaní experimentu a použitom teste alebo modeli). Treba zhodnotiť normalitu údajov, pričom v dodatku 5 sa uvádza, čo by sa malo vykonať s rezíduami z ANOVA. V dodatku 6 sa hovorí o ďalších aspektoch regresného prístupu. Mali by sa zvážiť transformácie na splnenie požiadaviek štatistického testu. Pri transformáciách s cieľom umožniť zavedenie regresného modelu však treba postupovať mimoriadne opatrne, keďže, napríklad, 25 % zmena v netransformovanej reakcii nezodpovedá 25 % zmene v transformovanej reakcii. Vo všetkých analýzach je jednotkou analýzy a experimentálnou jednotkou testovacia komora, nie jednotlivé ryby, čo by sa malo zohľadniť pri testoch hypotéz aj pri regresii (3) (14) (19) (20).

Skúšobný protokol

34. Skúšobný protokol by mal zahŕňať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

Jednozložková látka

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti;

— chemická identifikácia ako názov IUPAC alebo názov CAS, CAS číslo, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt podľa vhodnosti a praktickej realizovateľnosti atď. (prípadne vrátane obsahu organického uhlíka).

Viaczložková látka, UVCB a zmesi:

— čo najviac charakterizované, napr. chemickou identitou (pozri vyššie), kvantitatívnym výskytom a príslušnými fyzikálno-chemickými vlastnosťami zložiek.

Testovaný druh:

— vedecký názov, kmeň, zdroj a spôsob zberu oplodnených vajíčok a následná manipulácia.

▼M7

Podmienky testovania:

— použitý postup testovania (napr. semistatický alebo prietokový, nasádzanie),

— fotoperióda(-y),

— návrh štúdie (napr. počet testovacích komôr a replikátov, počet vajíčok na replikát, materiál a veľkosť testovacej komory (výška, šírka, objem), objem vody na testovaciu komoru),

— metóda prípravy zásobných roztokov a frekvencia obnovy (ak bol použitý solubilizačný prostriedok, mal by sa uviesť spolu s jeho koncentráciou),

— metóda dávkovania testovanej chemikálie (napr. čerpadlá, riediace systémy),

— miera výťažnosti metódy a nominálne testovacie koncentrácie, kvantifikačný limit, stredné hodnoty meraných hodnôt a ich štandardné odchýlky v testovacích nádobách a metóda, ktorou boli dosiahnuté, a dôkaz, že sa namerané hodnoty týkajú koncentrácií testovanej chemikálie v pravom roztoku,

— vlastnosti vody na riedenie: pH, tvrdosť vody, teplota, koncentrácia rozpusteného kyslíka, úroveň zvyškového chlóru (ak bola meraná), celkový obsah organického uhlíka (ak bol meraný), suspendované tuhé látky (ak boli merané), salinita v testovacom prostredí (ak bola meraná) a akékoľvek iné vykonané merania,

— kvalita vody v testovacích nádobách: pH, tvrdosť, teplota a koncentrácia rozpustného kyslíka,

— podrobné informácie o kŕmení (napr. druh potravy, zdroj, dávkované množstvo a frekvencia).

Výsledky uvádzané jednotlivo (alebo podľa replikátov) a ako priemer a variačný koeficient, podľa potreby, pre tieto ukazovatele:

— dôkaz, že v kontrolných skupinách bola splnená norma celkovej prípustnosti prežitia testovaných druhov (dodatok 2),

— údaje o úmrtnosti v každom štádiu (embryo, larva a mladý) a o kumulovanej úmrtnosti,

— dni potrebné na vyliahnutie, počty lariev vyliahnutých každý deň a koniec liahnutia,

— počet zdravých rýb na konci testu,

— údaje o dĺžke (uviesť buď štandardnú alebo celkovú) a hmotnosti zvierat, ktoré prežili,

— incidencia, opis a počet morfologických abnormalít, ak sa nejaké vyskytli,

— incidencia, opis a počet účinkov na správanie, ak sa nejaké vyskytli,

— prístup uplatnený pri štatistickej analýze (regresná analýza alebo analýza rozptylu) a spracovaní údajov (použitý štatistický test alebo model),

— koncentráciu bez pozorovaného účinku pre každú posudzovanú reakciu (NOEC),

▼M7

— najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (pri p = 0,05) pre každú posudzovanú reakciu (LOEC);

— hodnota EC_x pre každú posudzovanú reakciu, v prípade potreby, a intervaly spoľahlivosti (napr. 90 % alebo 95 %) a graf zavedeného modelu použitého na jej výpočet, sklon krivky koncentračnej závislosti, vzorec regresného modelu, odhadované parametre modelu a ich štandardné chyby.

Akákoľvek odchýlka od testovacej metódy.

Diskusia o výsledkoch vrátane akéhokoľvek vplyvu odchýlok od testovacej metódy na výsledok testu.

Tabuľka 1

Druhy rýb odporučené na testovanie

SLADKOVODNÉ RYBY	RYBY Z ÚSTÍ a MORSKÉ RYBY
Oncorhynchus mykiss pstruh dúhový	*Cyprinodon variegatus* kaprozúbka diamantová
Pimephales promelas čerebľa potočná	*Menidia* sp. menídia pobrežná
Danio rerio danio pruhované	
Oryzias latipes ryžovníčka japonská	

LITERATÚRA

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. a 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. a 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. a 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 a 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, a 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. a A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

16. Rao, J.N.K. a 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. a S.R. Petrocelli (1985), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.

20. McClave, J.T., J.H. Sullivan a J.G. Pearson (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼M7

Dodatok 1

DEFINÍCIE

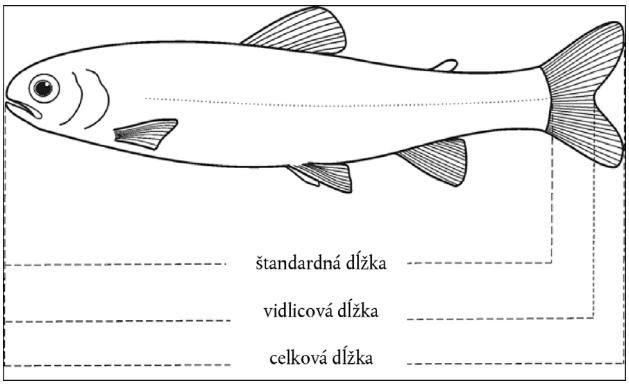
Vidlicová dĺžka (FL): označuje dĺžku od špičky rypáka po koniec stredných lúčov chvostových plutiev a používa sa pri rybách, pri ktorých je ťažké rozoznať, kde končí chrbtica (www.fishbase.org).

Štandardná dĺžka (SL): označuje dĺžku ryby meranú od špičky rypáka po zadný koniec posledného stavca alebo po zadný koniec stredu bočnej časti hypurálnej kosti. Jednoducho povedané, v tomto rozmere nie je zahrnutá dĺžka chvostovej plutvy (www.fishbase.org).

Celková dĺžka (TL): označuje dĺžku od špičky rypáka po koniec dlhšieho laloka chvostovej plutvy, spravidla meranú s lalokmi stlačenými pozdĺž stredovej čiary. Je to priamočiary rozmer, nemeraný cez zakrivenie tela (www.fishbase.org).

Obrázok 1

Opis rôznych používaných dĺžok



Chemikália: látka alebo zmes

EC_x: (Účinná koncentrácia pre x % účinok) je koncentrácia, ktorá počas daného trvania expozície vyvolá x % účinok na testované organizmy v porovnaní s kontrolnou skupinou. Napríklad EC_{50} je koncentrácia, pri ktorej sa odhaduje, že počas vymedzenej doby expozície vyvolá účinok na sledovaný ukazovateľ testu v 50 % exponovanej populácie.

Najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC) je najnižšia testovaná koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej je účinok chemikálie štatisticky významný (pri $p < 0,05$) v porovnaní s kontrolnou chemikáliou. Škodlivý účinok všetkých testovaných koncentrácií nad LOEC by však mal byť rovnaký alebo väčší ako účinok pozorovaný pri LOEC. Ak nie sú splnené tieto dve podmienky, treba poskytnúť úplné vysvetlenie spôsobu, akým sa zvolila LOEC (a teda aj NOEC). V dodatkoch 5 a 6 sa uvádza návod.

Koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC) je testovaná koncentrácia chemikálie ihneď pod LOEC, ktorá pri porovnaní s kontrolnou chemikáliou nemá štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) počas daného trvania expozície.

Testovaná chemikália: Každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

IUPAC: Medzinárodná únia pre čistú a aplikovanú chémiu.

SMILES: zjednodušený systém zadávania molekulárnych štruktúr.

▼M7

Dodatok 2

PODMIENKY A TRVANIE TESTU A KRITÉRIÁ PREŽITIA U ODPORUČENÝCH DRUHOV RÝB

DRUH	PODMIENKY TESTU			ODPORÚČANÉ TRVANIE TESTU	Typická minimálna priemerná celková dĺžka kontrolných rýb na konci štúdie (mm) (1)	PREŽITIE KONTROLNÝCH SKUPÍN (minimum)	
	Teplota (°C)	Salinita ($^0/_{00}$)	Fotoperióda (hod.)			Úspešné vyliahnutie	Počet vyliahnutých lariev, ktoré prežili
Sladkovodné:							
Oncorhynchus mykiss pstruh dúhový	10 ± 1,5 (2)		12 – 16 (3)	2 týždne po tom, ako kontrolné skupiny začnú prijímať potravu (alebo 60 dní po vyliahnutí)	40	75 %	75 %
Pimephales promelas čerebľa potočná	25 ± 1,5		16	32 dní od začiatku testu (alebo 28 dní po vyliahnutí)	18	70 %	75 %
Danio rerio danio pruhované	26 ± 1,5		12 – 16 (4)	30 dní po vyliahnutí	11	70 %	75 %
Oryzias latipes ryžovníčka japonská	25 ± 2		12 – 16 (5)	30 dní po vyliahnutí	17	80 %	80 %
Ryby z ústí a morské ryby:							
Cyprinodon variegatus kaprozúbka diamantová	25 ± 1,5	15 – 35 (5)	12 – 16 (4)	32 dní od začiatku testu (alebo 28 dní po vyliahnutí)	17	75 %	80 %
Menidia sp. menídia pobrežná	22 – 25	15 – 35 (5)	13	28 dní	20	80 %	60 %

Vysvetlivky:

(1) Typická minimálna priemerná celková dĺžka nie je kritériom validity, ale odchýlky pod uvedenou hodnotou by sa mali dôkladne preskúmať vo vzťahu k citlivosti testu. Minimálna priemerná celková dĺžka je odvodená z výberu aktuálne dostupných údajov.

(2) Konkrétny kmeň testovaného pstruha dúhového si môže vyžadovať použitie iných teplôt. Chov generačných rýb sa musí držať pri rovnakej teplote ako násada, ktorá sa má použiť na vajíčka. Po získaní vajíčok od komerčného chovateľa je po príchode potrebná krátka adaptácia (napr. 1 – 2 hod.) na testovaciu teplotu.

(3) Tma pre larvy až do jedného týždňa po vyliahnutí okrem vykonávania kontroly, následne tlmené osvetlenie počas celého testu (12 – 16-hodinová fotoperióda) (4).

(4) Pri akýchkoľvek podmienkach testu by mal byť režim osvetlenia konštantný.

(5) V prípade akéhokoľvek testu sa to vykoná do ± $2^0/_{00}$.

▼M7

Dodatok 3

NÁVOD NA KŔMENIE GENERAČNÝCH A TESTOVANÝCH ZVIERAT ODPORÚČANÝCH DRUHOV A NA MANIPULÁCIU S NIMI

DRUH	POTRAVA (*)				ČAS PRENOSU PO VYLIAHNUTÍ	ČAS DO PRVÉHO KŔMENIA
	Generačné ryby	Novo vyliahnuté larvy	Mladˇ			
			Typ	Frekvencia		
Sladkovodné:						
Oncorhynchus mykiss pstruh dúhový	potrava pre pstruhy	žiadna ([a])	štartovacia potrava pre pstruhy, BSN	2 – 4 kŕmenia denne	14 – 16 dní po vyliahnutí alebo pri vyplávaní (nie rozhodujúce)	19 dní po vyliahnutí alebo pri vyplávaní
Pimephales promelas čerebľa potočná	BSN, vločkové krmivo, FBS	BSN	BSN48, vločkové krmivo	2 – 3-krát denne	po vyliahnutí 90 % vajíčok	2 dni po vyliahnutí
Danio rerio danio pruhované	BSN, vločkové krmivo	Komerčné krmivo pre larvy, prvoky ([b]), bielkoviny ([c])	BSN48, vločkové krmivo,	BSN raz denne; vločkové krmivo dvakrát denne	po vyliahnutí 90 % vajíčok	2 dni po vyliahnutí
Oryzias latipes ryžovníčka japonská	vločkové krmivo	BSN, vločkové krmivo (alebo prvoky alebo vírniky)	BSN48, vločkové krmivo (alebo vírniky)	BSN raz denne; vločkové krmivo dvakrát denne alebo vločkové krmivo a vírniky raz denne	neuplatňuje sa	6 – 7 dní po vytretí
Ryby z ústí a morské ryby:						
Cyprinodon variegatus kaprozúbka diamantová	BSN, vločkové krmivo, FBS	BSN	BSN48	2 – 3 kŕmenia denne	neuplatňuje sa	1 deň po vyliahnutí/pri vyplávaní
Menidia sp. menídia pobrežná	BSN48, vločkové krmivo	BSN	BSN48	2 – 3 kŕmenia denne	neuplatňuje sa	1 deň po vyliahnutí/pri vyplávaní

Vysvetlivky:

(*) Potrava by sa mala podávať až do nasýtenia. Nadbytočná potrava a výkaly by sa mali podľa potreby odstrániť, aby sa nehromadil odpad.

FBS mrazené žiabronôžky soľné; dospelé jedince *Artemia* sp.
BSN nauplia žiabronôžok soľných; novo vyliahnuté
BSN48 nauplia žiabronôžok soľných; 48 hodín staré
([a]) larvy so žĺtkovým vakom si nevyžadujú žiadnu potravu
([b]) filtrované zo zmiešanej kultúry
([c]) granule z fermentačného procesu

02008R0440 — SK — 16.10.2019 — 008.001 — 2448

▼M7

Dodatok 4

NIEKTORÉ CHEMICKÉ VLASTNOSTI VODY VHODNEJ NA RIEDENIE

Zložka	Hraničná koncentrácia
Tuhé častice	5 mg/l
Celkový obsah organického uhlíka	2 mg/l
Neionizovaný amoniak	1 µg/l
Zvyškový chlór	10 µg/l
Celkový obsah organofosfátových pesticídov	50 ng/l
Celkový obsah organochlórových pesticídov a polychlórovaných bifenylov	50 ng/l
Celkový obsah organického chlóru	25 ng/l
Hliník	1 µg/l
Arzén	1 µg/l
Chróm	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Meď	1 µg/l
Železo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikel	1 µg/l
Zinok	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Ortuť	100 ng/l
Striebro	100 ng/l

▼M7

Dodatok 5

ŠTATITICKÉ USMERNENIE NA STANOVENIE NOEC

Všeobecné informácie

Jednotkou analýzy je nádrž s replikátom. To znamená, že pre kontinuálne merania, ako je veľkosť, by sa mala vypočítať priemerná alebo mediánová hodnota replikátu a tieto hodnoty replikátu sa stanú údajmi pre analýzu. Mala by sa preukázať sila vykonávaných testov, najlepšie na základe príslušnej historickej databázy pre každé laboratórium. Pre každý ukazovateľ by sa mal poskytnúť účinok na veľkosť, ktorý možno zistiť so 75 – 80 % silou, a to spolu so štatistickým testom, ktorý sa má použiť.

Podľa databáz dostupných v čase vypracúvania tejto testovacej metódy sa určí sila, ktorá je možná na základe odporúčaných štatistických postupov. Jednotlivé laboratóriá by mali preukázať svoju schopnosť splniť túto požiadavku na silu buď vykonaním svojej vlastnej analýzy sily alebo preukázaním toho, že variačný koeficient (CV) pre žiadnu reakciu neprekračuje 90. percentil CV použitých pri vypracúvaní usmernení na vykonávanie testov. V tabuľke 1 sú uvedené tieto CV. Ak sú k dispozícii len priemerné alebo mediánové hodnoty replikátu, CV v rámci replikátu možno ignorovať.

Tabuľka 1

90. percentil CV pre zvolené sladkovodné druhy

Druh	Reakcia	CV_medzi replikátmi	CV_v rámci replikátov
Pstruh dúhový	dĺžka	17,4	9,8
	hmotnosť	10,1	28
Čerebľa potočná	dĺžka	16,9	13,5
	hmotnosť	11,7	38,7
Danio pruhované	dĺžka	43,7	11,7
	hmotnosť	11,9	32,8

Takmer pri všetkých štatistických testoch používaných na vyhodnocovanie laboratórnych toxikologických štúdií majú dôležitosť porovnania skupín s aplikovanou chemikáliou s kontrolnými skupinami. Preto nie je vhodné pred použitím Dunnettovho alebo Williamsovho testu požadovať významný ANOVA F-test alebo pred použitím Jonckheereho-Terpstrovho, Mannovho-Whitneyho alebo Dunnovho testu požadovať významný Kruskalov-Wallisov test (Hochberg a Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al*. 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Dunnettov test má v sebe zabudovanú úpravu mnohopočetnosti a na jeho mieru falošných pozitívnych a falošných negatívnych nálezov má nepriaznivý vplyv použitie F-testu ako kontrolného testu. Podobne sa step-down Williamsovým a Jonckheereho-Terpstrovým testom trendu používajúcimi v každom kroku úroveň významnosti 0,05 zachováva celková 5 % miera falošných pozitívnych nálezov a túto mieru a silu testov nepriaznivo ovplyvňuje používanie F-testu alebo Kruskalovho-Wallisovho testu ako kontrolného testu. Mannov-Whitneyho a Dunnov test sa musí upraviť na mnohopočetnosť, pričom sa odporúča Bonferroniho-Holmova úprava.

Dôkladná diskusia o väčšine odporúčaní k testovaniu hypotéz a overovaniu predpokladov, z ktorých tieto testy vychádzajú, je uvedená v dokumente OECD z roku 2006, kde sa takisto uvádza rozsiahla bibliografia.

▼M7

Spracovanie kontrolných skupín pri použití rozpúšťadla

Kontrolná skupina s vodou na riedenie aj kontrolná skupina s rozpúšťadlom by sa mali zahrnúť, ak sa používa rozpúšťadlo. V týchto dvoch kontrolných skupinách sa porovná každá reakcia a, ak sa medzi nimi nezistí žiadny významný rozdiel, skombinujú sa na účely štatistickej analýzy. Inak by sa na stanovenie NOEC alebo odhad EC_x mala použiť kontrolná skupina s rozpúšťadlom a kontrolná skupina s vodou sa nepoužije. Pozri obmedzenia v kritériách platnosti (bod 7).

Pokiaľ ide o dĺžku, hmotnosť, pomer vyliahnutia vajíčok, úmrtnosti lariev alebo abnormálnych lariev a prvý alebo posledný deň liahnutia alebo vyplávanie, na porovnanie kontrolnej skupiny s vodou na riedenie a kontrolnej skupiny s rozpúšťadlom pri 0,05 hladine významnosti by sa mal použiť T-test alebo Mannov-Whitneyho test, pričom by sa mali ignorovať všetky skupiny s aplikovanou chemikáliou. Výsledky týchto testov by sa mali uviesť.

Merania veľkosti (dĺžka a hmotnosť)

Hodnoty dĺžky a hmotnosti jednotlivých rýb môžu byť rozložené normálne alebo logaritmicko-normálne. V obidvoch prípadoch majú stredné hodnoty replikátov tendenciu byť rozložené normálne v zmysle centrálnej limitnej vety a potvrdené z údajov z vyše 100 štúdií ELS troch sladkovodných druhov. Alternatívne tam, kde z údajov alebo historických databáz vyplýva logaritmicko-normálne rozdelenie hodnôt veľkostí jednotlivých rýb, možno vypočítať logaritmus priemernej veľkosti jednotlivých rýb replikátov a ako údaje pre analýzu možno potom použiť antilogaritmy týchto logaritmov priemernej hodnoty replikátov.

Údaje by sa mali vyhodnotiť z hľadiska konzistencie s normálnym rozložením a homogenitou rozptylu. Na tento účel by sa mali použiť reziduá z modelu ANOVA s koncentráciou ako jedinou vysvetľujúcou triednou premennou. Možno použiť vizuálne stanovenie z korelačných (bodových) grafov a histogramov alebo stonkových a listových (tzv. stem-and-leaf) grafov. Alternatívne možno použiť neformálny test, ako je Shapirov-Wilkov test alebo Andersonov-Darlingov test. Konzistentnosť s homogenitou rozptylu možno posúdiť na základe vizuálneho preskúmania toho korelačného (bodového) grafu alebo formálne z Levenovho testu. Len parametrické testy (napr. Williamsov, Dunnettov) treba vyhodnotiť z hľadiska normality alebo homogenity rozptylu.

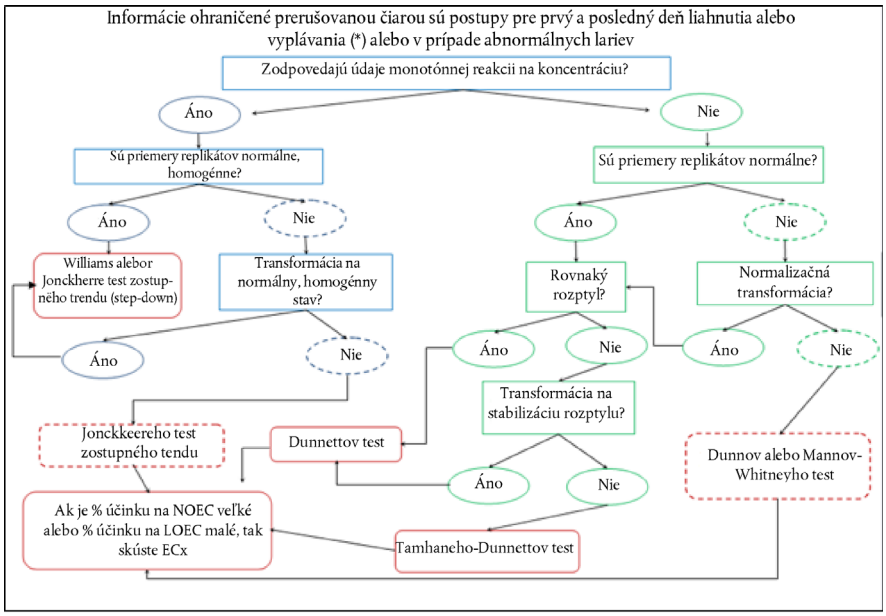
Mala by sa venovať pozornosť možným extrémnym hodnotám (outlier) a ich účinku na analýzu. Možno použiť Tukeyho test extrémnych hodnôt a vizuálnu kontrolu tých istých už opísaných diagramov reziduí. Treba pripomenúť, že pozorovaniami sú celé replikáty, takže k vypusteniu extrémnej hodnoty z analýzy by sa malo pristúpiť len po dôkladnom zvážení.

Štatistické testy, pri ktorých sa používajú charakteristiky návrhu experimentu a biologické očakávania, sú step-down testmi trendu, ako sú Williamsov a Jonckheereho-Terpstrov test. Tieto testy predpokladajú monotónnu koncentračnú závislosť a malo by sa posúdiť, či sú údaje v súlade s týmto predpokladom. To možno vykonať vizuálne z korelačného (bodového) grafu vzťahu medzi priemernými hodnotami replikátov a koncentráciami. Tento korelačný (bodový) graf by bolo vhodné prekryť úsekovým lineárnym grafom spájajúcim priemerné koncentrácie vážené veľkosťou vzorky replikátu. Veľká odchýlka tohto úsekového lineárneho diagramu od monotónnosti by naznačovala možnú potrebu použitia netrendových testov. Alternatívne možno použiť formálne testy. Jednoduchým formálnym testom je vypočítanie lineárnych a kvadratických kontrastov priemerných koncentrácií. Ak je kvadratický kontrast významný a lineárny kontrast nie je významný, naznačuje to možný problém s monotónnosťou, ktorej ďalšie hodnotenie by sa malo uskutočniť na základe diagramov. Ak môžu normalita alebo homogenita rozptylu predstavovať problém, možno tieto kontrasty zostaviť z údajov transformovaných podľa poradia. Možno použiť alternatívne postupy, ako je Bartholomewov test monotónnosti, pridávajú však na zložitosti.

▼M7

Obrázok 2

Vývojový diagram NOEC s meraniami veľkosti (dĺžka a hmotnosť)



(*) Tieto reakcie nikdy nespĺňajú predpoklady pre parametrickú analýzu alebo modely.

Pokiaľ nie sú údaje v súlade s požiadavkami týchto testov, NOEC sa stanoví uplatnením step-down Williamsovho alebo Jonckheereho-Terpstrovho testu trendu. V dokumente OECD z roku 2006 sa uvádzajú podrobnosti k tomuto postupu. Pre údaje, ktoré nie sú v súlade s požiadavkami na step-down test trendu, možno použiť Dunnettov test alebo Tamhaneho-Dunnettov (T3) test, z ktorých obidva majú zabudované úpravy pre mnohopočetnosť. Tieto testy predpokladajú normalitu a, v prípade Dunnettovho testu, homogenitu rozptylu. Ak nie sú tieto podmienky splnené, možno použiť Dunnov neparametrický test. V dokumente OECD z roku 2006 sa uvádzajú podrobnosti ku všetkým týmto testom. Na obrázku 2 je uvedený prehľad o tom, ako vybrať test.

Vyliahnutie vajíčok a prežitie lariev

Údaje predstavujú pomery vajíčok, z ktorých sa vyliahnu larvy, alebo lariev, ktoré prežijú v jednotlivých replikátoch. Pri týchto pomeroch by sa mal posúdiť extrabinomický rozptyl, ktorý je pri takýchto nameraných hodnotách bežný, ale nie univerzálny. Vývojový diagram na obrázku 3 poskytuje usmernenie k voľbe testu; podrobné opisy nájdete v texte.

Bežne sa používajú dva testy. Sú to Taroneho test C(α) (Tarone, 1979) a chí-kvadrát testy, každý použitý osobitne na každú testovaciu koncentráciu. Ak sa extrabinomický rozptyl zistí čo i len pri jednej testovacej koncentrácii, mali by sa použiť metódy, ktoré ho berú do úvahy.

Vzorec 1

Taroneho test C(α) (Tarone, 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \left(\frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} \right) - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^{m} n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

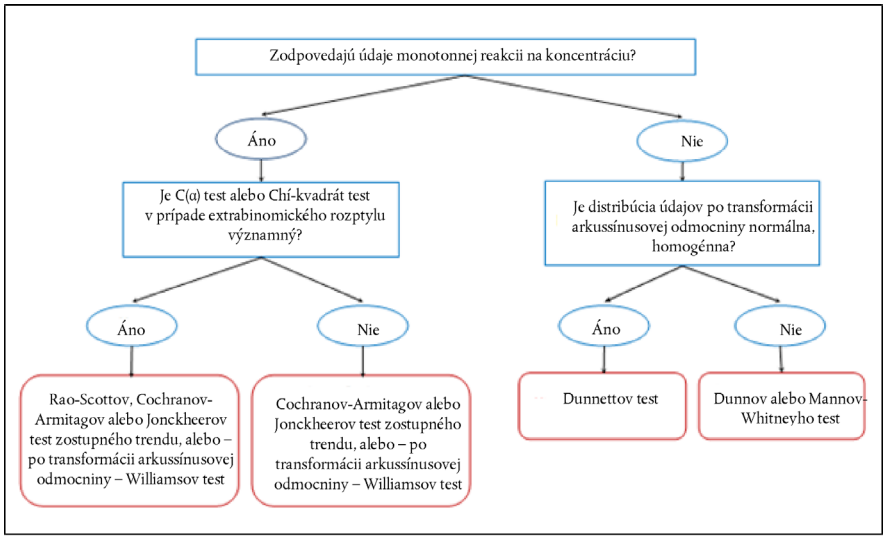
kde $\hat{p}$ je priemerný pomer pre danú koncentráciu, **m** je počet nádrží s replikátom, $\mathbf{n_j}$ je počet subjektov v replikáte **j** a $\mathbf{x_j}$ je počet reagujúcich subjektov v danom

▼M7

replikáte, teda nie vyliahnutých alebo mŕtvych. Tento test sa použije na každú koncentráciu osobitne. Tento test možno považovať za upravený chí-kvadrát test, ale obmedzené simulácie sily, ktoré vykonal Tarone, ukázali, že má väčšiu silu ako chí-kvadrát test.

Obrázok 3

Vývojový diagram NOEC pre vyliahnutie a úmrtnosť lariev



(*) Údaje sú pomerom replikátov

Tam, kde neexistuje žiadny významný dôkaz extrabinomického rozptylu, možno použiť step-down Cochranov-Armitageov test. Pri tomto teste sa ignorujú replikáty, takže tam, kde existuje dôkaz o takomto rozptyle, sa odporúča Raova-Scottova úprava Cochranovho-Armitageovho testu, ktorá zohľadňuje replikáty, veľkosti replikátov a extrabinomický rozptyl. Alternatívne testy zahŕňajú step-down Williamsov test, Jonckheereho-Terpstrov test a Dunnettov test, ako sa uvádza pri meraniach veľkosti. Tieto testy sa používajú bez ohľadu na existenciu extrabinomického rozptylu, ale majú o niečo menšiu silu (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao and Scott 1992, 1999, Fung *et al.* 1994, 1996).

Prvý alebo posledný deň liahnutia alebo vyplávanie

Reakcia je celé číslo udávajúce, ktorý deň došlo k pozorovaniu uvedeného javu v danej nádrži s replikátom. Rozsah hodnôt je všeobecne veľmi obmedzený a často je vysoký pomer viazaných hodnôt, napr. vo všetkých kontrolných replikátoch je pozorovaný ten istý prvý deň liahnutia a možno aj v jednej alebo dvoch nízkych testovacích koncentráciách. Parametrické testy ako Williamsov a Dunnettov nie sú na takéto údaje vhodné. Pokiaľ neexistuje dôkaz o vážnej nemonotónnosti, je na zistenie účinkov testovanej chemikálie veľmi vhodný step-down Jonckheereho-Terpstrov test trendu. Inak možno použiť Dunnov test.

Abnormality lariev

Reakciou je počet lariev, u ktorých sa zistí nejaká forma abnormality. Táto reakcia má často malý výskyt a spája sa s rovnakými problémami ako prvý deň liahnutia, a takisto niekedy vykazuje nepravidelnosť v koncentračnej závislosti. Ak údaje aspoň zhruba sledujú monotónny tvar koncentrácie, je na zistenie účinkov vhodný step-down Jonckheereho-Terpstrov test trendu. Inak možno použiť Dunnov test.

▼**M7**

ODKAZY

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 Teratology, Biometrics 31, 949-952.

Williams D.A. (1977). Some inference procedures for monotonically ordered normal means, Biometrika 64, 9-14.

▼M7

Dodatok 6

ŠTATISTICKÉ USMERNENIE NA STANOVENIE REGRESNÝCH ODHADOV

Všeobecné informácie

Pozorovania použité na zavedenie modelu sú stredné hodnoty replikátov (dĺžka a hmotnosť) alebo pomery replikátov (počet vyliahnutých vajíčok a úmrtnosť lariev) (OECD, 2006).

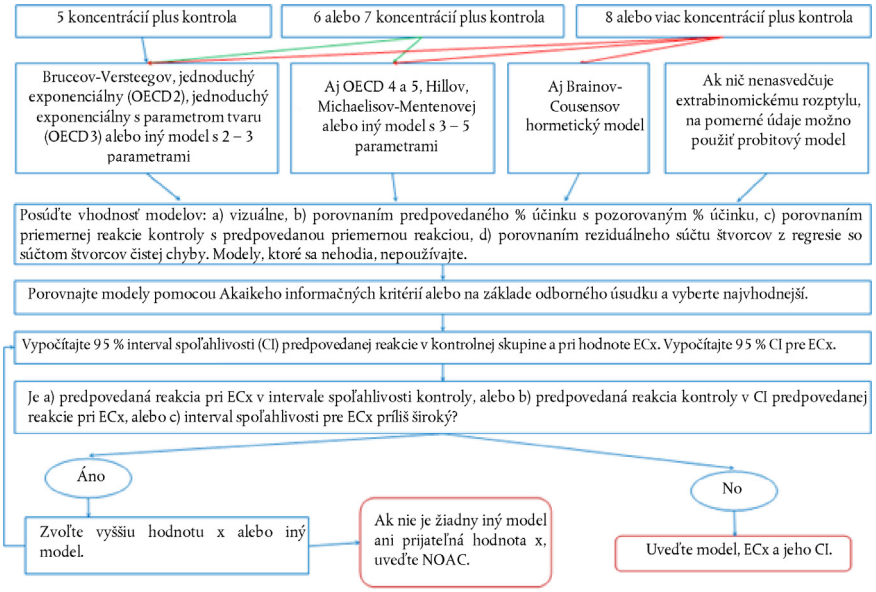
Všeobecne sa odporúča vážená regresia s použitím veľkosti vzorky replikátu ako váhy. Možno použiť ďalšie systémy váženia, napríklad váženie predpokladanou priemernou reakciou alebo kombináciou tohto systému a veľkosti vzorky replikátu. Váženie recipročnou hodnotou rozptylu vzorky v rámci koncentrácie sa neodporúča (Bunke *et al.* 1999, Seber a Wild, 2003, Motulsky and Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

Pri akejkoľvek transformácii reakcií pred analýzou by sa mala zachovať nezávislosť pozorovaní a hodnoty EC_x a jej hranice spoľahlivosti by sa mali vyjadriť v pôvodných meracích jednotkách, nie v transformovaných jednotkách. Napríklad 20 % zmena v logaritme dĺžky nie je ekvivalentná 20 % zmene dĺžky (Lyles *et.al* 2008, Draper a Smith 1999).

Vývojový diagram na obrázku 4 poskytuje prehľad odhadov ECx. Podrobnosti sú opísané v ďalšom texte.

Obrázok 4

Vývojový diagram odhadov EC_x priemernej dĺžky, hmotnosti alebo pomeru vyliahnutých lariev alebo úmrtnosti lariev replikátu, ďalšie podrobnosti nájdete v texte



Úvahy v súvislosti s liahnutím vajíčok a úmrtnosťou lariev

Pokiaľ ide o liahnutie vajíčok a úmrtnosť lariev, vo všeobecnosti je najlepšie zaviesť klesajúci model, pokiaľ sa nezavádza probitový model podľa ďalej uvedeného opisu. To znamená, že by sa mal vytvoriť model pomeru vajíčok, z ktorých sa nevyliahnu larvy, alebo lariev, ktoré uhynú. Dôvodom je to, že hodnota EC_x sa vzťahuje na koncentráciu, pri ktorej dochádza k zmene rovnajúcej sa x % priemernej reakcie kontrolnej skupiny. Ak je v kontrolnej skupine 5 % vajíčok, z ktorých sa nevyliahnu larvy, a ak sa na základe toho vytvorí model nevyliahnutia, potom sa EC_{20} vzťahuje na koncentráciu, pri ktorej je šanca rovnajúca sa 20 % z 5 % nevyliahnutí lariev v kontrolnej skupine, čo predstavuje zmenu 0,2 * 0,05 = 0,01 alebo 1 percentuálneho bodu do 6 % nevyliahnutia lariev. Takúto malú zmenu nemožno odhadnúť žiadnym zmysluplným spôsobom

▼M7

z dostupných údajov a nie je biologicky významná. Ak sa však vytvára model pomeru vajec, z ktorých sa vyliahnu larvy, pomer kontrolnej skupiny by bol v tomto príklade 95 % a 20 % pokles z priemernej hodnoty kontrolnej skupiny by predstavoval zmenu 0,95 * 0,2 = 0,18, takže z 95 % úspešného vyliahnutia na 77 % (= 95 – 18) úspešné vyliahnutie, pričom túto účinnú koncentráciu možno odhadnúť a má pravdepodobne väčší význam. Nejde o problém s nameranými hodnotami veľkosti, hoci nepriaznivé účinky na veľkosť spravidla znamenajú zníženie veľkosti.

Modely pre veľkosť (dĺžku alebo hmotnosť) a úspešné vyliahnutie vajíčok alebo prežitie lariev.

Okrem Brainovho-Cousensovho hormetického modelu sa všetky tieto modely opisujú a odporúčajú v dokumente OECD z roku 2006. V súvislosti s modelmi nazývanými OECD 2-5 sa Slobova práca z roku 2002 takisto zaoberá experimentmi na ekotoxicitu. Existuje, samozrejme, mnoho iných modelov, ktoré môžu byť užitočné. Bunke, *et al*. (1999) uvádzajú početný zoznam modelov, ktoré tu nie sú zahrnuté, a existuje mnoho odkazov na ďalšie modely. Modely uvedené ďalej sa odporúčajú ako zvlášť vhodné v experimentoch na ekotoxicitu a často sa používajú.

S 5 testovacími koncentráciami plus kontrolou

— Bruceov-Versteegov model,

— jednoduchý exponenciálny model (OECD 2),

— exponenciálny model s parametrom tvaru (OECD 3),

— jednoduchý exponenciálny model s dolnou hranicou (OECD 4).

So 6 testovacími koncentráciami plus kontrolou

— exponenciálny model s parametrom tvaru a dolnou hranicou (OECD 5),

— Michaelisov-Mentenovej model,

— Hillov model.

Ak existuje vizuálny dôkaz hormézy (nepravdepodobné pri úspešnom vyliahnutí alebo prežití lariev, ale občas ju možno zaznamenať pri pozorovaní veľkosti)

— Brainov-Cousensov hormetický model; Brain a Cousens (1989).

Alternatívne modely pre nevyliahnutie vajíčok a úmrtnosť lariev

— Na stúpajúce modely pre tieto reakcie možno použiť probitové (alebo logistické) modely, ak neexistuje žiadny dôkaz extrabinomického rozptylu a odhad výskytu v kontrole je súčasťou zavedeného modelu. Toto nie je uprednostňovaná metóda, pretože za jednotku analýzy považuje jedinca, nie replikát (Morgan 1992, O'Hara Hines a Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Vhodnosť zavedenia jedného modelu

— Vizuálne porovnajte pozorovaný a predpokladaný percentuálny pokles pri každej testovacej koncentrácii (Motulsky a Christopoulos 2004, Draper a Smith 1999).

— Porovnajte strednú kvadratickú chybu regresie s čistou strednou kvadratickou chybou pomocou F-testu (Draper a Smith 1999).

— Skontrolujte, či sa každý člen v modeli významne líši od nuly (t. j. určte, či sú všetky členy modelu dôležité), (Motulsky a Christopoulos 2004).

▼M7

— Diagramy reziduí z regresie oproti testovacej koncentrácii, pokiaľ možno na logaritmickej stupnici (koncentrácia). Tento diagram by nemal mať žiadny vzor, body by mali byť náhodne rozptýlené okolo horizontálnej línie v nulovej výške.

— Údaje by sa mali vyhodnotiť z hľadiska normality a homogenity rozptylu rovnako, ako sa uvádza v dodatku 5.

— Okrem toho by sa mala posúdiť normalita reziduí v rámci regresného modelu tými istými metódami, ktoré sú uvedené v dodatku 5 pre reziduá z ANOVA.

Porovnajte modely

— Použite Akaikeho AICc kritériá. Menšie hodnoty AICc označujú lepšie zavedené modely a, ak AICc(B) – AICc(A) ≥ 10, model A je takmer určite lepší ako model B (Motulsky a Christopoulos 2004).

— Porovnajte tieto dva modely vizuálne na základe toho, ako dobre spĺňajú uvedené kritériá jedného modelu.

— Odporúča sa princíp úspornosti, na základe ktorého sa použije najjednoduchší model, ktorý primerane dobre zodpovedá údajom (Ratkowsky 1993, Lyles et.al 2008).

Kvalita odhadu hodnoty EC_x

Interval spoľahlivosti (CI) pre hodnotu EC_x by nemal byť príliš široký. Na rozhodnutie o tom, aký široký môže byť interval spoľahlivosti, aby bola hodnota EC_x stále užitočná, je potrebný štatistický úsudok. Simulácie pre regresné modely prispôsobené údajom o liahnutí a veľkosti ukazujú, že okolo 75 % intervalov spoľahlivosti pre EC_x (x=10, 20 alebo 30) zahŕňa nie viac ako dve testovacie koncentrácie. To poskytuje všeobecný návod na to, čo je prijateľné, a praktický návod na to, čo možno dosiahnuť. Mnohí autori tvrdia, že treba uvádzať intervaly spoľahlivosti pre všetky parametre modelu a že široké intervaly spoľahlivosti pre parametre modelov poukazujú na neprijateľné modely (Ott a Longnecker 2008, Alvord a Rossio 1993, Motulsky a Christopoulos 2004, Lyles *et al.* 2008, Seber a Wild 2003, Bunke *et al*. 1999, Environment Canada 2005).

CI pre EC_x (alebo akýkoľvek iný parameter modelu) by nemal obsahovať nulu (Motulsky a Christopoulos 2004). Toto je v regresnom modeli ekvivalent minimálneho významného rozdielu, ktorý sa často cituje v prístupoch k testovaniu hypotéz (napr. Wang *et al* 2000). Takisto zodpovedá intervalu spoľahlivosti pre stredné reakcie pri LOEC neobsahujúcej priemernú hodnotu kontroly. Treba sa zamyslieť nad tým, či sú odhady parametrov vedecky možné. Napr. ako interval spoľahlivosti pre y0 je ±20 %, žiadny odhad EC_{10} nie je hodnoverný. Ak model predpokladá 20 % účinok pri koncentrácii C a maximálny pozorovaný účinok pri C a nižších koncentráciách je 10 %, potom hodnota EC_{20} nie je hodnoverná (Motulsky and Christopoulos 2004, Wang *et al.* 2000, Environment Canada 2005).

Hodnota EC_x by si nemala vyžadovať extrapoláciu mimo rozsahu pozitívnych koncentrácií (Draper a Smith 1999, OECD 2006). Napríklad všeobecným návodom by mohlo byť, že hodnota EC_x by nemala byť viac než okolo 25 % pod najnižšou testovanou koncentráciou alebo nad najvyššou testovanou koncentráciou.

ODKAZY

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993). Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, Journal of Immunological Methods 157, 155-163.

Brain P. a 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. a 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. a 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, a 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. a 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, a 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. KRÁTKODOBÝ REPRODUKČNÝ TEST NA RYBÁCH

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 229 (2012). Potreba vypracovať a validovať test na rybách schopný odhaliť chemikálie s účinkom na endokrinný systém vychádza z obavy, že úroveň týchto chemikálií v životnom prostredí môže mať škodlivé účinky na ľudí aj na voľne žijúce živočíchy v dôsledku pôsobenia týchto chemikálií na endokrinný systém. Organizácia OECD v roku 1998 iniciovala aktivitu s vysokou prioritou s cieľom zrevidovať existujúce usmernenia a vypracovať nové usmernenia na vykonávanie skríningu a testov potenciálnych endokrinných disruptorov. Jednou zložkou tejto aktivity bolo vypracovanie usmernenia na vykonávanie testov pre skríning chemikálií s účinkom na endokrinný systém určitých druhov rýb. Krátkodobý reprodukčný test na rybách podstúpil rozsiahly program validácie pozostávajúci z medzilaboratórnych štúdií s vybranými chemikáliami na preukázanie relevantnosti a spoľahlivosti testu na odhalenie chemikálií, ktoré rôznymi mechanizmami vplývajú na reprodukciu rýb vrátane zmien endokrinného systému (1, 2, 3, 4, 5). Všetky ukazovatele usmernenia OECD na vykonávanie testov boli validované na čerebli potočnej a podmnožina ukazovateľov bola validovaná na ryžovníčke japonskej (medaka) (t. j. vitelogenín a sekundárne pohlavné znaky) a na daniu pruhovanom (t. j. vitelogenín). Validácia bola čiastočne partnersky preskúmaná panelom odborníkov menovaných národnými koordinátormi programu OECD pre usmernenia na vykonávanie testov (6) a nezávislým panelom odborníkov, ktorých si objednala Agentúra Spojených štátov na ochranu životného prostredia (29). Tento test nie je určený na identifikáciu špecifických mechanizmov hormonálneho narušenia, lebo testované zvieratá majú intaktnú os hypotalamus – hypofýza – gonády (HHG), ktorá môže reagovať na ovplyvňujúce chemikálie na rôznych úrovniach.

2. Táto testovacia metóda opisuje skríningový test *in vivo*, v rámci ktorého sa pohlavne dospelí samci a neresiace sa samice rýb držia spolu a vystavia sa pôsobeniu chemikálie počas obmedzenej etapy ich životného cyklu (21 dní). Po skončení 21-dňovej expozície sa u samcov a samíc odmerajú dva biomarkerové ukazovatele ako indikátory endokrinnej aktivity testovanej chemikálie; týmito ukazovateľmi sú vitelogenín a sekundárne pohlavné znaky. Vitelogenín sa meria pri čerebli potočnej, ryžovníčke japonskej a daniu pruhovanom, zatiaľ čo sekundárne pohlavné znaky iba pri čerebli potočnej a ryžovníčke japonskej. Okrem toho sa počas testu denne monitoruje kvantitatívna plodivosť. Gonády sú takisto zachované a na posúdenie reprodukčného zdravia testovaných zvierat a zvýšenie váhy dôkazov iných ukazovateľov možno vyhodnotiť histopatológiu.

3. Tento biologický test slúži ako skríningový test *in vivo* a jeho použitie by sa malo posudzovať v kontexte „Koncepčného rámca OECD na testovanie a hodnotenie chemikálií ako endokrinných disruptorov“ (30). V tomto koncepčnom rámci sa krátkodobý reprodukčný test na rybách navrhuje na úrovni 3 ako test *in vivo* poskytujúci údaje o vybranom endokrinnom mechanizme(-och)/endokrinnej ceste(-ách).

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

4. Vitelogenín (VTG) sa spravidla vytvára v pečeni samíc vajcorodých stavovcov ako reakcia na cirkulujúci endogénny estrogén. Je to prekurzor proteínov vaječného žĺtka a po vzniku v pečeni sa krvným obehom dostáva k vaječníkom, ktoré ho prijmú a modifikujú v procese tvorby vajíčok. Vitelogenín je takmer nezistiteľný v plazme nedospelých samíc a samcov rýb, pretože nemajú dostatok cirkulujúceho estrogénu; ich pečeň je však schopná syntetizovať a vylučovať vitelogenín v prípade stimulácie exogénnym estrogénom.

▼M7

5. Meranie vitelogenínu slúži na zisťovanie chemikálií s rôznymi estrogénnymi mechanizmami pôsobenia. Estrogénne chemikálie možno zisťovať meraním indukcie vitelogenínu v telách samcov rýb, čo bolo veľakrát zdokumentované v partnersky preskúmanej vedeckej literatúre [napr. (7)]. Indukcia vitelogenínu sa preukázala aj po vystavení pôsobeniu aromatizovateľných androgénov (8, 9). Zníženie úrovne cirkulácie estrogénu v telách samíc, napríklad v dôsledku inhibície aromatázy konverziou endogénneho androgénu na prírodný estrogén 17β-estradiol, spôsobuje pokles úrovne VTG, čo sa používa na zisťovanie chemikálií s vlastnosťami inhibície aromatázy (10, 11). Biologický význam reakcie vitelogenínu na estrogénne pôsobenie alebo inhibíciu aromatázy je preukázaný a vo veľkej miere zdokumentovaný. Je však možné, že tvorbu VTG v telách samíc môže ovplyvňovať aj všeobecná toxicita a iné ako endokrinné toxické mechanizmy pôsobenia, napríklad hepatotoxicita.

6. Viaceré metódy merania boli úspešne vyvinuté a štandardizované na bežné použitie. Je tak aj v prípade druhovo špecifických metód enzýmového imunosorbentového stanovenia (ELISA) využívajúcich imunochémiu na kvantifikáciu VTG produkovaného v malých vzorkách krvi alebo pečene odobratých z jednotlivých rýb (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Na meranie VTG sa odoberajú vzorky krvi čereble potočnej, krvi alebo homogenátu hlavy/chvosta dania pruhovaného a pečene ryžovníčky japonskej. V prípade ryžovníčky japonskej existuje dobrá korelácia medzi VTG meraným z krvi a z pečene (19). Dodatok 6 obsahuje odporúčané postupy odberu vzoriek na analýzu VTG. Súpravy na meranie VTG sú bežne dostupné, pričom by tieto súpravy mali byť založené na validovanej druhovo špecifickej metóde ELISA.

7. Sekundárne pohlavné znaky samcov určitých druhov rýb sú zvonku viditeľné, kvantifikovateľné a citlivé na cirkulujúce úrovne endogénnych androgénov. Týka sa to čereble potočnej a ryžovníčky japonskej, ale nie dania pruhovaného, ktoré nemá kvantifikovateľné sekundárne pohlavné znaky. Samice si udržiavajú schopnosť vývoja samčích sekundárnych pohlavných znakov, ak sú vystavené pôsobeniu androgénnym chemikáliám vo vode. Vo vedeckej literatúre sú k dispozícii viaceré štúdie dokumentujúce tento typ reakcie pri jedincoch druhu čereble potočnej (20) a ryžovníčky japonskej (21). Interpretácia úbytku sekundárnych pohlavných znakov pri samcoch by mala byť opatrná vzhľadom na nízku štatistickú silu a mala by byť založená na odbornom posudku a závažnosti dôkazov. Použitie dania pruhovaného v rámci tohto testu je obmedzené, keďže nemá kvantifikovateľné sekundárne pohlavné znaky citlivé na androgénne účinky chemikálií.

8. V prípade čereble potočnej je hlavným indikátorom pôsobenia exogénneho estrogénu počet tuberkulov nachádzajúcich sa na rypáku samíc rýb. V prípade ryžovníčky japonskej predstavuje hlavný marker exogénneho pôsobenia androgénnych chemikálií na samice rýb počet papilárnych výbežkov. V dodatkoch 5A a 5B sú uvedené odporúčané postupy, ktoré treba dodržiavať pri hodnotení vývoja pohlavných znakov čereble potočnej, a ryžovníčky japonskej, v uvedenom poradí.

9. 21-dňový test na rybách zahŕňa vyhodnotenie kvantitatívnej produkcie vajíčok a zachovanie gonád na voliteľné histopatologické vyšetrenie. Niektoré regulačné orgány môžu vyžadovať tento dodatočný ukazovateľ na kompletnejšie vyhodnotenie reprodukčného zdravia testovaných zvierat alebo v prípadoch, keď vitelogenín a sekundárne pohlavné znaky nereagovali na vystavenie chemikálii. Hoci niektoré ukazovatele môžu mať vysokú diagnostickú hodnotu (napr. indukcia VTG u samcov a tvorba tuberkulov u samíc), nie všetky ukazovatele (napr. plodivosť a histopatológia gonád) v teste majú jednoznačne identifikovať špecifické bunkové mechanizmy pôsobenia. Súbor ukazovateľov skôr kolektívne umožňuje vyvodzovanie záverov v súvislosti s možnými narušeniami endokrinného systému, a teda

▼M7

poskytujú usmernenie na ďalšie testovanie. Hoci plodivosť nie je endokrinologicky špecifická, v dôsledku jej preukázanej citlivosti na mnohé známe chemikálie s účinkom na endokrinný systém (5) ju treba zahrnúť ako dôležitý ukazovateľ, pretože keď zostane spoločne s inými ukazovateľmi neovplyvnená, je väčšia istota, že zlúčenina pravdepodobne nemá účinok na endokrinný systém. Keď je však plodivosť ovplyvnená, významne prispeje pri vyvodzovaní záverov o váhe dôkazov. Návod na interpretáciu údajov a na uznanie výsledkov testu je uvedený ďalej v rámci tejto testovacej metódy.

10. Definície použité v tejto testovacej metóde sú uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

11. V rámci skúšky sa samci a samice rýb v reprodukčnom stave spoločne vystavia pôsobeniu chemikálie v testovacích nádobách. Ich stav dospelosti a reprodukčný stav umožňuje jasné rozlíšenie obidvoch pohlaví, a teda analýzu každého sledovaného ukazovateľa s ohľadom na pohlavie, a zabezpečuje ich citlivosť na exogénne chemikálie. Po ukončení testu sa pohlavie potvrdí makroskopickým skúmaním gonád po ventrálnom otvorení brušnej dutiny nožnicami. Prehľad príslušných podmienok biologickej analýzy je uvedený v dodatku 2. Skúška sa spravidla začína výberom vzorky rýb z populácie, ktorá je v stave neresenia, pričom by sa nemali používať starnúce živočíchy. Usmernenie týkajúce sa veku rýb a ich reprodukčného stavu sa uvádza v časti o výbere rýb. Test sa vykonáva s použitím troch expozičných koncentrácií chemikálie, ako aj s kontrolnou skupinou s vodou a, ak je to potrebné, s kontrolnou skupinou s rozpúšťadlom. Pri daniu pruhovanom sa používajú dve nádoby alebo replikáty na jednu úroveň aplikácie chemikálie (každá nádoba obsahuje 5 samcov a 5 samíc). Pri čerebli potočnej sa používajú štyri nádoby alebo replikáty na jednu úroveň aplikácie chemikálie (každá nádoba obsahuje 2 samcov a 4 samice). Ide o zohľadnenie teritoriálneho správania samcov čereble potočnej pri súčasnom zachovaní dostatočnej sily testu. Pri ryžovníčke japonskej sa používajú štyri nádoby alebo replikáty na jednu úroveň aplikácie chemikálie (každá nádoba obsahuje 3 samcov a 3 samice). Expozícia trvá 21 dní a odber vzoriek rýb sa vykoná v 21. deň expozície. Kvantitatívna plodivosť sa monitoruje denne.

12. Pre odber vzoriek v 21. deň sa všetky živočíchy humánne usmrtia. Sekundárne pohlavné znaky sa zisťujú pri čerebli potočnej a ryžovníčke japonskej (pozri dodatok 5A a dodatok 5B); na stanovenie VTG v tele dania pruhovaného a čereble potočnej sa odoberú vzorky krvi, pričom alternatívne možno na stanovenie VTG v tele dania pruhovaného odobrať hlavy/chvosty (dodatok 6); na analýzu VTG v tele ryžovníčky japonskej sa odoberie pečeň (dodatok 6); gonády sa fixujú buď v celku alebo rozrezané na možné histopatologické vyhodnotenie (22).

AKCEPTAČNÉ KRITÉRIÁ TESTU

13. Na to, aby boli výsledky testu prijateľné, musia byť splnené tieto podmienky:

— úmrtnosť v kontrolných skupinách s vodou (alebo s rozpúšťadlom) na konci trvania expozície by nemala prekročiť hodnotu 10 %,

— koncentrácia rozpusteného kyslíka by mala byť počas trvania expozície aspoň 60 % hodnoty saturácie vzduchom (ASV),

— teplota vody by sa v žiadnom okamihu počas expozície nemala líšiť o viac ako ± 1,5 °C medzi testovacími nádobami a mala by sa udržiavať v rozsahu 2 °C v rámci teplotných rozsahov špecifikovaných pre daný testovaný druh (dodatok 2),

— malo by byť preukázateľné, že koncentrácia testovanej chemikálie v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v rozsahu ± 20 % stredných nameraných hodnôt,

▼M7

— malo by byť preukázané, že ryby sa aktívne neresia vo všetkých replikátoch pred začatím chemickej expozície a v kontrolných replikátoch počas testu.

OPIS METÓDY

Prístrojové vybavenie

14. Bežné laboratórne vybavenie, a najmä tieto zariadenia:

a) zariadenie na meranie kyslíka a pH meter;

b) zariadenie na stanovenie tvrdosti a alkality vody;

c) vhodné zariadenie na reguláciu teploty a podľa možnosti na kontinuálne monitorovanie;

d) nádrže z chemicky inertného materiálu a vhodného objemu vo vzťahu k odporúčanej veľkosti násady a chovnej hustote (pozri dodatok 2);

e) substrát na neresenie pre čerebľu potočnú a danio pruhované (potrebné údaje sú uvedené v dodatku 4);

f) dostatočne presné váhy (t. j. s presnosťou na ±0,5 mg).

Voda

15. Každú vodu, v ktorej testovaný druh vykazuje vyhovujúco dlhotrvajúce prežívanie a rast, možno použiť na testovanie, Mala by mať konštantnú kvalitu počas celého trvania testu. pH vody by mal byť v rozsahu od 6,5 do 8,5, ale počas daného testu by mal byť v rozsahu ± 0,5 jednotky pH. S cieľom zabezpečiť, aby voda na riedenie nemala prílišný vplyv na výsledok testu (napr. tvorbou komplexu testovanej chemikálie), v určitých intervaloch by sa z nej mali odoberať vzorky. Ak je známe, že voda na riedenie má relatívne stálu kvalitu, zisťovanie ťažkých kovov (napr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd a Ni), hlavných aniónov a katiónov (napr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}a SO_4^{2-}), pesticídov (napr. celkového obsahu organofosfátových a organochlórových pesticídov), celkového obsahu organického uhlíka a suspendovaných tuhých látok by sa malo vykonávať napríklad každé tri mesiace. Ak sa preukázalo, že kvalita vody je stabilná najmenej počas jedného roka, merania možno vykonávať menej často a časové intervaly medzi nimi možno predĺžiť (napr. na každých šesť mesiacov). Niektoré chemické vlastnosti vody vhodnej na riedenie sú uvedené v dodatku 3.

Testovacie roztoky

16. Testovacie roztoky vybraných koncentrácií sa pripravujú riedením zásobného roztoku. Zásobný roztok by sa mal podľa možností pripraviť jednoduchým miešaním alebo trepaním testovanej chemikálie vo vode na riedenie mechanickým prostriedkom (napr. miešadlom alebo ultrazvukom). Na dosiahnutie zásobného roztoku vhodnej koncentrácie možno použiť saturačné kolóny (rozpúšťacie kolóny). Použitie rozpúšťadla ako nosiča sa neodporúča. Ak je však rozpúšťadlo potrebné, mala by sa súbežne pripraviť kontrolná skupina s rozpúšťadlom s rovnakou koncentráciou rozpúšťadla, aká je v skupinách s aplikovanou chemikáliou. Pri ťažko testovateľných chemikáliách by mohlo byť rozpúšťadlo technicky najlepším riešením, mal by sa však konzultovať usmerňovací dokument OECD o testovaní toxicity zložitých látok a zmesí vo vodnom prostredí (23). Výber rozpúšťadla bude daný chemickými vlastnosťami látky alebo zmesi. V usmerňovacom dokumente OECD sa odporúča maximálna hodnota 100 µl/l, ktorá by sa mala dodržiavať. Nedávny prieskum (24) však poukázal na ďalšie problémy pri používaní rozpúšťadiel v rámci testovania endokrinného pôsobenia. Preto sa v prípadoch, keď je použitie rozpúšťadla potrebné, odporúča minimalizovať jeho koncentráciu všade tam, kde je to technicky možné (v závislosti od fyzikálno-chemických vlastností testovanej chemikálie).

▼M7

17. Používať sa bude prietokový testovací systém. Takýmto systémom sa kontinuálne rozdeľuje a riedi zásobný roztok testovanej chemikálie (napr. dávkovacím čerpadlom, proporcionálnym zrieďovačom, saturačným systémom) s cieľom dodať sériu koncentrácií do testovacích komôr. Prietoky zásobných roztokov a vody na riedenie by sa mali počas testu kontrolovať v určitých intervaloch, najlepšie denne, a ich hodnoty by sa nemali v priebehu celého testu meniť viac ako o 10 %. Pozornosť by sa mala venovať tomu, aby sa nepoužívali potrubia z plastov s nízkym stupňom kvality alebo z iných materiálov, ktoré môžu obsahovať biologicky aktívne chemikálie. Pri výbere materiálu pre prietokový systém by sa mala zvážiť možná adsorpcia testovanej chemikálie na tento materiál.

Chov rýb

18. Testované ryby by sa mali vyberať z laboratórnej populácie, podľa možnosti z jednej zásoby, ktorá sa aklimatizovala najmenej dva týždne pred testom v podobných podmienkach, pokiaľ ide o kvalitu vody a osvetlenie, aké sa použijú v rámci testu. Je dôležité, aby veľkosť násady a chovná hustota (definície sú uvedené v dodatku 1) boli vhodné pre použitý testovaný druh (pozri dodatok 2).

19. Po 48-hodinovej privykacej (adaptačnej) fáze sa zaznamená úmrtnosť a uplatnia sa tieto kritériá:

— úmrtnosť počas siedmich dní prevyšuje 10 % populácie: celá násada sa vyradí,

— úmrtnosť 5 % až 10 % populácie: aklimatizovať ďalších sedem dní; ak je úmrtnosť počas uvedených ďalších siedmich dní vyššia ako 5 %, celá násada sa vyradí,

— úmrtnosť je počas siedmich dní nižšia ako 5 % populácie: násada sa akceptuje.

20. Ryby by nemali byť podrobené liečeniu chorôb počas aklimatizácie, v období pred expozíciou, ani počas expozície.

Obdobie pred expozíciou a výber rýb

21. Odporúča sa, aby sa zvieratá umiestnili do nádob podobných tým, ktoré sa použijú v rámci skutočného testu, na obdobie jedného až dvoch týždňov pred expozíciou. Ryby by sa mali kŕmiť *ad libitum* počas celého obdobia chovu a počas fázy expozície. Fáza expozície sa začína s pohlavne dimorfnými dospelými rybami z laboratórnej zásoby reprodukčne zrelých zvierat (napr. s jasne viditeľnými sekundárnymi pohlavnými znakmi v prípade čereble potočnej a ryžovníčky japonskej) vo fáze aktívneho neresenia. Tieto údaje slúžia iba ako všeobecné usmernenie (a nemali by sa brať do úvahy izolovane od pozorovania skutočného reprodukčného stavu danej dávky rýb). Čereble potočné by mali byť približne v 20. (± 2) týždni života za predpokladu, že počas celého života boli chované pri teplote 25 ± 2 °C. Ryžovníčky japonské by mali byť približne v 16. (± 2) týždni života za predpokladu, že počas celého života boli chované pri teplote 25 ± 2 °C. Dania pruhované by mali byť približne v 16. (± 2) týždni života za predpokladu, že počas celého života boli chované pri teplote 26 ± 2 °C. Produkcia vajíčok by sa mala v období pred expozíciou posudzovať denne. Pred zahrnutím nádrží s replikátmi do expozičnej fázy testu sa odporúča pozorovať neresenie vo všetkých vo všetkých z nich. Pokiaľ ide o dennú produkciu vajíčok, v tomto štádiu nie je možné poskytnúť kvantitatívne usmernenie, je však pomerne bežné pri každom druhu pozorovať priemerné neresenie > 10 vajíčok/samica/deň. S cieľom zaistiť vyvážené rozloženie replikátov by sa podľa objemu produkcie vajíčok mal použiť náhodný blokový návrh, v rámci ktorého by sa replikáty pridelili na rôzne experimentálne úrovne.

▼M7

PLÁN ŠTÚDIE

22. Používajú sa tri koncentrácie testovanej chemikálie, jedna kontrolná skupina (s vodou), a ak je to potrebné, jedna kontrolná skupina s rozpúšťadlom. Údaje možno analyzovať s cieľom určiť štatisticky významné rozdiely medzi reakciami v skupinách s aplikovanou chemikáliou a v kontrolných skupinách. Tieto analýzy skôr poskytnú informáciu o tom, či je potrebné ďalšie dlhodobé testovanie nepriaznivých účinkov chemikálie (a to na prežitie, rozvoj, rast a reprodukciu), než o ich použiteľnosti na účely hodnotenia rizika (25).

23. V prípade dania pruhovaného sa 21. deň testu u samcov a samíc na každej úrovni aplikácie chemikálie (5 samcov a 5 samíc v každom z dvoch replikátov) a v kontrolných skupinách odoberú vzorky na meranie vitelogenínu. V prípade ryžovníčky japonskej sa 21. deň testu u samcov a samíc na každej úrovni aplikácie chemikálie (3 samcov a 3 samíc v každom zo štyroch replikátov) a v kontrolných skupinách odoberú vzorky na meranie vitelogenínu a na preskúmanie sekundárnych pohlavných znakov. V prípade čereble potočnej sa 21. deň expozície u samcov a samíc (2 samcov a 4 samíc v každom zo štyroch replikátov) a v kontrolných skupinách odoberú vzorky na meranie vitelogenínu a na preskúmanie sekundárnych pohlavných znakov. Vyžaduje sa kvantitatívne hodnotenie plodivosti a gonádne tkanivá by sa mali fixovať v celku alebo rozrezané na možné histopatologické vyhodnotenie, v prípade potreby.

Výber testovacích koncentrácií

24. Na účely tohto testu by sa najvyššia testovacia koncentrácia mala stanoviť vo výške maximálnej tolerovanej koncentrácie (MTC), ktorá sa určí testom na zistenie rozsahu alebo z iných údajov o toxicite, alebo vo výške 10 mg/l, alebo na základe maximálnej rozpustnosti vo vode podľa toho, ktorá hodnota je najnižšia. MTC je definovaná ako najvyššia testovacia koncentrácia chemikálie, ktorá spôsobuje úmrtnosť nižšiu ako 10 %. Pri tomto prístupe sa predpokladá, že existujú empirické údaje o akútnej toxicite alebo iné údaje o toxicite, na základe ktorých je možné odhadnúť hodnotu MTC. Odhad hodnoty MTC môže byť nepresný a spravidla sa vyžaduje určitý odborný posudok.

25. Potrebné sú tri testovacie koncentrácie s konštantným faktorom rozstupu nepresahujúcim hodnotu 10 a kontrolná skupina s vodou na riedenie (v prípade potreby aj kontrolná skupina s rozpúšťadlom). Odporúčaná hodnota faktoru rozstupu by mala byť v rozsahu od 3,2 do 10.

POSTUP

Výber a váženie testovaných rýb

26. Je dôležité hneď na začiatku testu minimalizovať variabilitu hmotnosti rýb. Vhodný rozsah veľkostí pre jednotlivé druhy rýb odporučený na tento test je uvedený v dodatku 2. Pre celý súbor rýb použitých v rámci testu platí, že rozsah individuálnych hmotností samcov a samíc na začiatku testu by sa mal držať podľa možnosti v rozsahu ± 20 % aritmetického priemeru hmotnosti jedincov rovnakého pohlavia. Odporúča sa odvážiť aj čiastkovú vzorku zásoby rýb pred testom, aby bolo možné odhadnúť priemernú hmotnosť.

Podmienky expozície

Trvanie

27. Test trvá 21 dní nasledujúcich po období pred expozíciou. Odporúčané obdobie pred expozíciou je jeden až dva týždne.

Kŕmenie

28. Ryby by sa mali kŕmiť *ad libitum* vhodnou potravou (dodatok 2) dostatočne často, aby sa udržiaval ich telesný stav. Treba dbať na to, aby sa predišlo rastu mikroorganizmov a zakaleniu vody. Ako všeobecné usmernenie platí, že dennú dávku možno rozdeliť do dvoch alebo troch rovnakých porcií

▼M7

podávaných vo viacerých kŕmeniach za deň, pričom jednotlivé kŕmenia majú byť oddelené najmenej trojhodinovými prestávkami. Jedna väčšia porcia je prijateľná najmä počas víkendov. Ryby by sa nemali kŕmiť počas 12 hodín pred odberom vzoriek/pitvou.

29. Potrava pre ryby by sa mala vyhodnotiť z hľadiska prítomnosti kontaminantov, ako sú organochlórové pesticídy, polycyklické aromatické uhľovodíky (PAU), polychlórované bifenyly. Vylúčiť by sa mala potrava so zvýšenou úrovňou fytoestrogénov, ktorá by ovplyvnila reakciu pri teste v dôsledku známych agonistov estrogénu (napr. 17β- estradiol).

30. Nezožraná potrava a fekálny materiál by sa mali odstraňovať z testovacích nádob najmenej dvakrát týždenne, napríklad dôkladným vyčistením dna každej nádrže odsávaním.

Svetlo a teplota

31. Fotoperióda a teplota vody by mali byť vhodné pre dané testované druhy (pozri dodatok 2).

Frekvencia analytických stanovení a meraní

32. Pred spustením expozície treba zabezpečiť riadne fungovanie systému prísunu chemikálie. Pripraviť by sa mali všetky potrebné analytické metódy vrátane dostatočných vedomostí o chemickej stabilite v testovacom systéme. Počas testu sa koncentrácie testovanej chemikálie určujú v pravidelných intervaloch takto: prietoky riedidla a zásobného roztoku toxickej látky by sa mali kontrolovať podľa možnosti denne, ale minimálne dvakrát za týždeň, a nemali by sa počas celého testu meniť viac ako o 10 %. Odporúča sa merať skutočné koncentrácie testovanej chemikálie vo všetkých nádobách na začiatku testu a potom v týždenných intervaloch.

33. Odporúča sa, aby výsledky vychádzali z nameraných koncentrácií. Ak bola koncentrácia testovanej chemikálie v roztoku uspokojivo udržiavaná v rozsahu ± 20 % nominálnej koncentrácie počas celého testu, výsledky môžu vychádzať buď z nominálnych, alebo z nameraných hodnôt.

34. Vzorky je možno potrebné filtrovať (napr. cez filter s veľkosťou pórov 0,45 μm) alebo odstreďovať. V prípade potreby je odstreďovanie odporúčaným postupom. Ak sa však testovaný materiál neadsorbuje na filtri, aj filtrácia je prijateľná.

35. Počas testu by sa najmenej raz za týždeň mala merať koncentrácia rozpusteného kyslíka, teplota a hodnota pH vo všetkých testovacích nádobách. Najmenej raz za týždeň by sa mala merať celková tvrdosť vody a alkalita v kontrolných nádobách a v jednej nádobe s najvyššou koncentráciou. Teplota by sa mala podľa možnosti monitorovať kontinuálne aspoň v jednej testovacej nádobe.

Pozorovania

36. V priebehu alebo na konci testu sa posudzujú viaceré všeobecné (napr. prežitie) a biologické reakcie (napr. úroveň VTG). Vyžaduje sa denné kvantitatívne monitorovanie plodivosti. Meranie a hodnotenie týchto ukazovateľov a ich využitie sú opísané v ďalších bodoch.

Prežitie

37. Ryby by sa mali počas testovacieho obdobia denne prehliadnuť, každý úhyn by sa mal zaznamenať a uhynutá ryba čo najskôr odstrániť. Mŕtve ryby by sa nemali nahrádzať ani v kontrolných nádobách, ani v nádobách s aplikovanou chemikáliou. Pohlavie rýb, ktoré uhynuli počas testu, by sa malo určiť makroskopickým hodnotením gonád.

▼M7

Správanie a vzhľad

38. Akékoľvek abnormálne správanie (v porovnaní s kontrolnými skupinami) by sa malo zaznamenať; môže ísť o príznaky všeobecnej toxicity vrátane hyperventilácie, nekoordinovaného plávania, straty rovnováhy a atypickej nehybnosti alebo atypického kŕmenia. Okrem toho by sa mali zaznamenať aj vonkajšie abnormality (ako napríklad krvácanie, strata farby). Takéto príznaky toxicity by sa mali starostlivo zvážiť pri interpretácii údajov, lebo môžu naznačovať existenciu koncentrácií, pri ktorých biomarkery endokrinného pôsobenia nie sú spoľahlivé. Takéto pozorovania správania môžu poskytovať aj užitočné kvalitatívne informácie na vypracovanie potenciálnych budúcich požiadaviek na vykonávanie testov s rybami. Napríklad, v prípade normálnych samcov a maskulinizovaných samíc čereble potočnej vystavených androgénnemu pôsobeniu bola pozorovaná teritoriálna agresivita; v prípade dania pruhovaného sa po vystavení estrogénnemu alebo antiandrogénnemu pôsobeniu znižuje alebo brzdí charakteristická aktivita pri párení a neresení po navodení svetelných podmienok svitania.

39. Keďže niektoré aspekty vzhľadu (predovšetkým farba) sa môžu rýchlo zmeniť pri manipulácii, je dôležité, aby sa kvalitatívne pozorovania vykonávali pred vybratím živočíchov z testovacieho systému. Doterajšie skúsenosti s druhom čereble potočnej naznačujú, že niektoré chemikálie s účinkom na endokrinný systém môžu najskôr vyvolať zmeny týchto vonkajších znakov: farba tela (svetlá alebo tmavá), vzorované sfarbenie (prítomnosť zvislých pruhov) a tvar tela (hlavová a prsná oblasť). Pozorovania fyzického vzhľadu rýb by sa preto mali vykonávať v priebehu celého testu a na záver štúdie.

Plodivosť

40. Denné kvantitatívne pozorovania neresenia by sa mali zaznamenávať podľa replikátov. Produkcia vajíčok by sa mala zaznamenávať ako počet vajíčok/samicu, ktorá prežila/deň podľa replikátov. Vajíčka sa budú z testovacích komôr odstraňovať denne. V prípade čereble potočnej a dania pruhovaného by sa mali substráty na neresenie umiestniť do testovacej komory, aby sa rybám umožnilo neresiť sa v normálnych podmienkach. V dodatku 4 sa uvádzajú ďalšie podrobnosti o odporúčaných substrátoch na neresenie pre danio pruhované (dodatok 4A) a čerebľu potočnú (dodatok 4B). Poskytnutie substrátu na neresenie pre ryžovníčku japonskú sa nepovažuje za nevyhnutné.

Humánne usmrcovanie rýb

41. V 21. deň, t. j. po ukončení expozície, by sa ryby mali usmrtiť primeraným množstvom trikaínu [trikaín metán sulfonát, Metacain, MS-222 (CAS 886-86-2)], 100 – 500 mg/l, tlmeného pridaním 300 mg/l $NaHCO_3$ (hydrogenuhličitan sodný, CAS 144-55-8) na zníženie podráždenia slizníc; potom sa odoberú vzorky krvi alebo tkaniva na stanovenie VTG, ako je vysvetlené v časti o vitelogeníne.

Pozorovanie sekundárnych pohlavných znakov

42. Niektoré chemikálie s účinkom na endokrinný systém môžu vyvolávať zmeny špecializovaných sekundárnych pohlavných znakov (počet tuberkulov u samcov čereble potočnej, papilárnych výbežkov u samcov ryžovníčky japonskej). Najmä chemikálie s určitými mechanizmami pôsobenia môžu vyvolávať abnormálny výskyt sekundárnych pohlavných znakov u zvierat opačného pohlavia; napríklad agonisty androgénových receptorov, ako sú trenbolón, metyltestosterón a dihydrotestosterón, môžu spôsobovať vyvinutie výrazných tuberkulov u samíc čereble potočnej alebo papilárnych výbežkov u samíc ryžovníčky japonskej (11, 20, 21). Uvádza sa takisto, že agonisty estrogénových receptorov môžu znížiť počet tuberkulov a veľkosť záhlavnej časti chrbta u dospelých samcov čereble potočnej (26, 27). Takéto celkové

▼M7

morfologické pozorovania môžu poskytovať užitočné kvalitatívne a kvantitatívne informácie na vypracovanie potenciálnych budúcich požiadaviek na vykonávanie testov s rybami. Počet a veľkosť tuberkulov u čereble potočnej a papilárnych výbežkov u ryžovníčky japonskej možno kvantifikovať priamo alebo praktickejšie na konzervovaných exemplároch. V dodatkoch 5A a 5B sú uvedené odporúčané postupy hodnotenie sekundárnych pohlavných znakov čereble potočnej a ryžovníčky japonskej v uvedenom poradí.

Vitelogenín (VTG)

43. Krv sa odoberá z chvostovej tepny/žily heparinizovanou mikrohematokritovou kapilárou alebo alternatívne srdcovou punkciou pomocou striekačky. V závislosti od veľkosti rýb sa objem krvi, ktorú je možné odobrať, vo všeobecnosti pohybuje v rozsahu – 60 µl na jedinca čereble potočnej a 5 – 15 µl na jedinca dania pruhovaného. Plazma sa oddelí od krvi odstredením a uchová sa s inhibítorom proteázy pri teplote – 80 °C, pokým nebude analyzovaná na prítomnosť VTG. Alternatívne sa ako zdroj tkaniva na stanovenie VTG použije pečeň v prípade ryžovníčky japonskej a homogenát hlavy/chvosta v prípade dania pruhovaného (dodatok 6). Meranie VTG by malo byť založené na validovanej homologickej metóde ELISA s použitím homologického štandardu VTG a homologických protilátok. Odporúča sa použiť metódu, ktorou možno zistiť množstvo VTG na úrovni niekoľkých ng/ml plazmy (alebo ng/mg tkaniva), čo je úroveň pozadia v tele samcov rýb, ktoré neboli vystavené chemikálii.

44. Kontrola kvality analýzy VTG sa vykoná s použitím štandardov, slepých vzoriek a aspoň duplicitnej analýzy. Pre každú metódu ELISA by sa mal na určenie minimálneho faktora riedenia vzorky vykonať test na matricový efekt (efekt zriedenia vzorky). Každá platnička ELISA používaná v rámci testov na zistenie VTG by mala obsahovať tieto vzorky na kontrolu kvality: najmenej 6 kalibračných štandardov zahŕňajúcich rozsah očakávaných koncentrácií VTG a najmenej jednu nešpecifickú viazanú testovaciu slepú vzorku (analyzuje sa duplicitne). Absorbancia týchto slepých vzoriek by mala byť nižšia ako 5 % maximálnej absorbancie kalibračného štandardu. Analyzovať sa budú najmenej dve alikvotné časti (paralelné) každého zriedenia vzorky. Paralelné vzorky, ktoré sa líšia o viac ako 20 %, by sa mali opätovne analyzovať.

45. Korelačný koeficient (R^2) pre kalibračné krivky by mal byť väčší ako 0,99. Vysoká korelácia však nie je dostatočná na to, aby sa zaručilo primerané predvídanie koncentrácie vo všetkých rozsahoch. Okrem dostatočne vysokej korelácie pre kalibračnú krivku by koncentrácia každého štandardu, ktorá sa vypočíta z kalibračnej krivky, mala ležať v rozsahu 70 – 120 % nominálnej koncentrácie. Ak sa nominálne koncentrácie odkláňajú od kalibračnej regresnej priamky (napr. pri nižších koncentráciách), môže byť nevyhnutné rozdeliť kalibračnú krivku na nízky a vysoký rozsah, alebo použiť nelineárny model, ktorý primerane zodpovedá údajom o absorbancii. Ak sa krivka rozdelí, obidve jej časti by mali mať $R^2 > 0,99$.

46. Detekčný limit (LOD) je definovaný ako koncentrácia najnižšieho analytického štandardu a kvantifikačný limit (LOQ) je definovaný ako súčin koncentrácie najnižšieho analytického štandardu a najnižšieho faktora riedenia.

47. Každý deň, keď sa vykonávajú testy na zistenie VTG, sa bude analyzovať obohatená vzorka s použitím „inter-assay“ referenčného štandardu (dodatok 7). Spolu s výsledkami z každého súboru testov vykonaných v tento deň sa uvádza pomer očakávanej koncentrácie a nameranej koncentrácie.

Vyhodnotenie histopatológie gonád

48. Vykonanie histopatológie gonád môžu vyžadovať regulačné orgány na preštudovanie cieľového orgánu na osi HHG po vystavení chemikálii. V tomto zmysle sa gonády fixujú buď v celku alebo rozrezané. Keď sa vyžaduje histopatológia, budú sa pri posudzovaní endokrinného pôsobenia testovanej chemikálie hľadať špecifické reakcie na gonádach súvisiace s endokrinným

▼M7

systémom. Tieto diagnostické reakcie v zásade zahŕňajú prítomnosť testikulárnych oocytov, Leydigovej bunkovej hyperplázie, zníženú tvorbu žĺtka, zvýšené množstvo spermatogónií a perifolikulárnu hyperpláziu. Ďalšie lézie gonád, ako je atrézia oocytov, degenerácia semenníkov a zmeny v štádiách, môžu mať rôzne príčiny. V pokynoch k histopatológii rybích gonád sa stanovujú postupy, ktoré sa budú používať pri rozrezaní, fixovaní, narezaní tenkých vrstiev a histopatologickom vyhodnotení gonád (22).

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Vyhodnocovanie reakcií biomarkerov analýzou rozptylu (ANOVA)

49. Na zistenie potenciálneho pôsobenia chemikálie sa porovnávajú reakcie v skupinách s aplikovanou chemikáliou a reakcie v kontrolných skupinách pomocou analýzy rozptylu (ANOVA). Ak sa použije kontrolná skupina s rozpúšťadlom, mali by sa pre každý sledovaný ukazovateľ vykonať vhodné štatistické testy na porovnanie kontrolných skupín s vodou na riedenie a kontrolných skupín s rozpúšťadlom. Usmernenia k spôsobu spracovania údajov z kontrolných skupín s vodou na riedenie a kontrolných skupín s rozpúšťadlom v následnej štatistickej analýze možno nájsť v dokumente OECD 2006c (28). Všetky údaje o biologických reakciách by sa mali analyzovať a uvádzať osobitne podľa pohlavia. Ak sa nesplnia požadované predpoklady parametrických metód – iné ako normálne rozdelenie (napr. Shapirov-Wilkov test) alebo heterogénny rozptyl (Barlettov alebo Levenov test), malo by sa zvážiť transformovanie údajov pred vykonaním analýzy ANOVA tak, aby sa dosiahli homogénne rozptyly, alebo vykonanie váženej ANOVA. V prípade nemonotónnej závislosti reakcie od dávky možno použiť Dunnettov test (parametrický) na viacnásobné párové porovnávanie alebo Mannov-Whitneyho test s Bonferroniho úpravou (neparametrický). Ak je závislosť reakcie od dávky približne monotónna, možno použiť iné štatistické testy (napr. Jonckheereho-Terpstrov test trendu alebo Williamsov test). V dodatku 8 je uvedený štatistický vývojový diagram, ktorý má pomôcť pri rozhodovaní o najvhodnejšom štatistickom teste, ktorý sa má použiť. Doplnkové informácie možno získať aj z dokumentu OECD o súčasných prístupoch v štatistickej analýze údajov o ekotoxicite (28).

Popis výsledkov testu

50. Údaje zo štúdie by mali zahŕňať:

Testovacie zariadenie:

— zodpovední pracovníci a ich úlohy v rámci štúdie,

— každé laboratórium by malo preukázať odbornosť v používaní škály reprezentatívnych chemikálií.

Testovaná chemikália:

— charakteristika testovanej chemikálie,

— fyzikálny charakter a dôležité fyzikálno-chemické vlastnosti,

— metóda a frekvencia prípravy testovacích koncentrácií,

— informácie o stabilite a biodegradovateľnosti.

Rozpúšťadlo:

— charakteristika rozpúšťadla (povaha, použitá koncentrácia),

— odôvodnenie výberu rozpúšťadla (ak je iné ako voda).

▼M7

Testované zvieratá:

— druh a kmeň,

— dodávateľ a konkrétne zariadenie dodávateľa,

— vek rýb na začiatku testu a stav reprodukcie/neresenia,

— údaje o postupe aklimatizácie zvierat,

— telesná hmotnosť rýb na začiatku expozície (z podvzorky populácie rýb).

Podmienky testovania:

— použitý postup testovania (druh testu, veľkosť násady, chovná hustota atď.),

— metóda prípravy zásobných roztokov a prietok,

— nominálne testovacie koncentrácie, týždenne merané koncentrácie testovacích roztokov a použitá analytická metóda, stredné namerané hodnoty a štandardné odchýlky v testovacích nádobách a dôkaz o tom, že merania zodpovedajú koncentráciám testovanej chemikálie v skutočnom roztoku,

— vlastnosti vody na riedenie (vrátane pH, tvrdosti, alkality, teploty, koncentrácie rozpusteného kyslíka, úrovne zvyškového chlóru, celkového obsahu organického uhlíka, suspendovaných tuhých látok a výsledkov akýchkoľvek iných vykonaných meraní),

— kvalita vody v testovacích nádržiach: pH, tvrdosť, teplota a koncentrácia rozpustného kyslíka,

— podrobné informácie o kŕmení [napr. druh potravy, zdroj, dávkované množstvo a frekvencia a analýza príslušných kontaminantov (napr. polychlórované bifenyly, polycyklické aromatické uhľovodíky a organochlórové pesticídy), ak je k dispozícii].

Výsledky

— dôkaz, že kontrolné skupiny splnili akceptačné kritériá testu,

— údaje o úmrtnosti vyskytujúcej sa pri každej z testovacích koncentrácií a v kontrolnej skupine,

— používané štatistické analytické techniky, spracovanie údajov a odôvodnenie použitia daných techník,

— údaje o biologických pozorovaniach celkovej morfológie vrátane sekundárnych pohlavných znakov, tvorbe vajíčok a VTG,

— výsledky analýz údajov, najlepšie v tabuľkovej a grafickej forme,

— výskyt akýchkoľvek neobvyklých reakcií rýb a akýchkoľvek viditeľných účinkov vyvolaných testovanou chemikáliou.

▼M7

USMERNENIE KINTERPRETÁCII A AKCEPTÁCII VÝSLEDKOV TESTU

51. Táto časť obsahuje niekoľko aspektov, ktoré treba brať do úvahy pri interpretácii výsledkov testu pre jednotlivé merané ukazovatele. Výsledky by sa mali interpretovať opatrne, ak sa zdá, že testovaná chemikália má zjavné toxické účinky alebo ovplyvňuje celkový stav testovaného zvieraťa.

52. S cieľom umožniť zmysluplnú interpretáciu údajov by sa pri stanovení rozsahu testovacích koncentrácií malo dbať na to, aby sa neprekročila maximálna tolerovaná koncentrácia. Je dôležité mať najmenej jednu skupinu s aplikovanou chemikáliou, v ktorej nie sú žiadne príznaky toxických účinkov. Príznaky choroby a príznaky toxických účinkov by sa mali dôkladne vyhodnotiť a zaznamenať. Je napríklad možné, že produkciu VTG v telách samíc môže ovplyvňovať aj všeobecná toxicita a neendokrinné toxické mechanizmy pôsobenia, napríklad hepatotoxicita. Interpretáciu účinkov však možno podporiť inými množstvami aplikovanej chemikálie, ktoré si nemožno pomýliť so systémovou toxicitou.

53. Existuje niekoľko aspektov, ktoré treba brať do úvahy pri akceptácii výsledkov testu. Ako usmernenie platí, že úrovne VTG v kontrolných skupinách samcov a samíc by sa mali odlišovať a mali by ich oddeľovať približne tri rádové hodnoty v prípade čereble potočnej a dania pruhovaného a približne jedna rádová hodnota v prípade ryžovníčky japonskej. Príklady rozsahu hodnôt, ktoré sa vyskytli v kontrolných skupinách a v skupinách s aplikovanou chemikáliou, sú k dispozícii vo validačných správach (1, 2, 3, 4). Vysoké hodnoty VTG kontrolných samcov by mohli ohroziť citlivosť testu a jeho schopnosť odhaliť slabé agonisty estrogénu. Nízke hodnoty VTG samíc v kontrolných skupinách by mohli ohroziť citlivosť testu a jeho schopnosť odhaliť inhibítory aromatázy a antagonisty estrogénu. Na vypracovanie tohto usmernenia sa použili validačné štúdie.

54. Kvantifikácia tvorby vajíčok podlieha značnej variabilite [variačný koeficient (CV) sa môže pohybovať od 20 do 60 %], ktorá ovplyvňuje schopnosť testu odhaliť významný pokles produkcie vajíčok menší ako 70 % v prípade, že sa CV blíži k 50 % alebo je vyšší. Keď je CV obmedzený na nižšie hodnoty (okolo 20 – 30 %), potom bude mať test prijateľnú silu (80 %) na odhalenie 40 – 50 % poklesu tvorby vajíčok. Plán štúdie použitý pre čerebľu potočnú, zahŕňajúci štyri replikáty na úroveň aplikácie chemikálie, by mal umožniť väčšiu silu vo vzťahu k ukazovateľu plodivosti v porovnaní s plánom testu len s 2 replikátmi.

55. Ak laboratórium predtým nevykonávalo tento test alebo nastali podstatné zmeny (napr. zmena kmeňa rýb alebo dodávateľa), je vhodné realizovať štúdiu technickej spôsobilosti. Odporúča sa použitie chemikálií, ktoré zahŕňajú rôzne mechanizmy pôsobenia alebo vplyvu na viaceré ukazovatele testu. V praxi sa každému laboratóriu odporúča, aby si budovalo svoju vlastnú historickú databázu kontrolných údajov pre samcov a samice a aby používalo chemikáliu na pozitívnu kontrolu na estrogénne pôsobenie (napr. 17β-estradiol, 100 ng/l, alebo známe slabé agonisty), ktoré vedie k zvýšeniu množstva VTG u samcov rýb, chemikáliu na pozitívnu kontrolu na inhibíciu aromatázy (napr. fadrozol alebo prochloraz, 300 µg/l), ktorá vedie k zníženiu množstva VTG u samíc rýb, a chemikáliu na pozitívnu kontrolu na androgénne pôsobenie (napr. 17β-trenbolón, 5 µg/l), ktoré vedie k vzniku sekundárnych pohlavných znakov u samíc čereble potočnej a ryžovníčky japonskej. Všetky tieto údaje možno porovnať s dostupnými údajmi z validačných štúdií (1, 2, 3), aby sa zabezpečila spôsobilosť laboratória.

56. Vo všeobecnosti by sa meranie VTG malo považovať za pozitívne, ak v porovnaní s kontrolnou skupinou existuje štatisticky významné zvýšenie množstva VTG u samcov ($p < 0,05$) alebo štatisticky významný pokles u samíc ($p < 0,05$) aspoň pri najvyššej testovanej dávke a ak sa nevyskytnú

▼M7

príznaky všeobecnej toxicity. Pozitívny výsledok ďalej podporí preukázanie biologicky hodnoverného vzťahu medzi dávkou a reakčnou krivkou. Ako už bolo uvedené, pokles VTG nemusí mať výlučne endokrinný pôvod; pozitívny výsledok by sa však mal vo všeobecnosti interpretovať ako dôkaz endokrinného pôsobenia *in vivo* a mal by spravidla viesť k opatreniam na ďalšie objasnenie.

57. Regulačné orgány môžu vyžadovať vyhodnotenie histopatológie gonád s cieľom stanoviť reprodukčné zdravie testovaných zvierat a umožniť posúdenie váhy dôkazov vyplývajúcich z výsledkov testu. Výsledky histopatológie gonád nemusia byť nevyhnutné v prípadoch, keď buď VTG alebo sekundárne pohlavné znaky sú pozitívne (t. j. zvýšenie alebo pokles VTG alebo vznik sekundárnych pohlavných znakov).

LITERATÚRA

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 (accessed 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. a 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 17β-estradiol and 17α-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. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. 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 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 47, 129 – 145.

27. Martinovic D., *et al.* (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

28. OECD (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, 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**

Dodatok 1

SKRATKY A DEFINÍCIE

Chemikália: látka alebo zmes

CV: variačný koeficient

ELISA: enzýmové imunosorbentové stanovenie

Os HHG (hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPG): os hypotalamus – hypofýza – gonády

Veľkosť násady: mokrá hmotnosť rýb na objem vody

MTC: maximálna tolerovaná koncentrácia, ktorá predstavuje približne 10 % hodnoty LC_{50}

Chovná hustota: je počet rýb na objem vody

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje touto testovacou metódou.

VTG: vitelogenín je fosfolipoglykoproteín, slúžiaci ako prekurzor proteínov vaječného žĺtka, ktorý sa normálne vyskytuje v telách pohlavne aktívnych samíc všetkých vajcorodých druhov.

▼M7

Dodatok 2

EXPERIMENTÁLNE PODMIENKY SKRÍNINGU NA ENDOKRINNOM SYSTÉME RÝB

1. Odporúčaný druh	Čerebľa potočná (*Pimephales promelas*)	Ryžovníčka japonská (*Oryzias latipes*)	Danio pruhované (*Danio rerio*)
2. Typ testu	prietokový	prietokový	prietokový
3. Teplota vody	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Kvalita osvetlenia	Žiarivky (širokospektrálne)	Žiarivky (širokospektrálne)	Žiarivky (širokospektrálne)
5. Intenzita svetla	10 – 20 µE/m^2/s, 540 – 1 000 luxov alebo 50 – 100 ft-c (úrovne v laboratórnom prostredí)	10 – 20 µE/m^2/s, 540 – 1 000 luxov alebo 50 – 100 ft-c (úrovne v laboratórnom prostredí)	10 – 20 µE/m^2/s, 540 – 1 000 luxov alebo 50 – 100 ft-c (úrovne v laboratórnom prostredí)
6. Fotoperióda (prechody ako svitanie/súmrak sú voliteľné, ale nepovažujú sa za nutné)	16 hodín svetla a 8 hodín tmy	12 – 16 hodín svetla a 12 – 8 hodín tmy	12 – 16 hodín svetla a 12 – 8 hodín tmy
7. Veľkosť násady	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Veľkosť skúšobnej komory	10 l (minimálne)	2 l (minimálne)	5 l (minimálne)
9. Objem testovacieho roztoku	8 l (minimálne)	1,5 l (minimálne)	4 l (minimálne)
10. Výmeny objemu testovacích roztokov	minimálne 6 denne	minimálne 5 denne	minimálne 5 denne
11. Vek testovaných organizmov	pozri bod 21	pozri bod 21	pozri bod 21
12. Približná mokrá hmotnosť dospelých rýb (g)	samice: 1,5 ± 20 % samce 2,5 ± 20 %	samice: 0,35 ± 20 % samce 0,35 ± 20 %	samice: 0,65 ± 20 % samce 0,4 ± 20 %
13. Počet rýb na testovaciu nádobu	6 (2 samce a 4 samice)	6 (3 samce a 3 samice)	10 (5 samci a 5 samíc)
14. Počet skupín s aplikovanou chemikáliou	= 3 (plus primerané kontrolné skupiny)	= 3 (plus primerané kontrolné skupiny)	= 3 (plus primerané kontrolné skupiny)
15. Počet nádob na každú úroveň aplikácie chemikálie	najmenej 4	najmenej 4	najmenej 2
16. Počet rýb na každú testovaciu koncentráciu	16 dospelých samíc a 8 samcov (4 samice a 2 samci v každej nádobe s replikátom)	12 dospelých samíc a 12 samcov (3 samice a 3 samci v každej nádobe s replikátom)	10 dospelých samíc a 10 samcov (5 samíc a 5 samci v každej nádobe s replikátom)
17. Kŕmny režim	živé alebo mrazené dospelé jedince alebo nauplia žiabronôžky soľnej dva- alebo trikrát denne (*ad libitum*), komerčne dostupná potrava alebo kombinácia uvedenej potravy	nauplia žiabronôžky soľnej dva- alebo trikrát denne (*ad libitum*), komerčne dostupná potrava alebo kombinácia uvedenej potravy	nauplia žiabronôžky soľnej dva- alebo trikrát denne (*ad libitum*), komerčne dostupná potrava alebo kombinácia uvedenej potravy

▼M7

18. Prevzdušňovanie	žiadne, pokiaľ koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesne pod 60 % hodnoty saturácie vzduchom	žiadne, pokiaľ koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesne pod 60 % hodnoty saturácie vzduchom	žiadne, pokiaľ koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesne pod 60 % hodnoty saturácie vzduchom
19. Voda na riedenie	s čistým povrchom, studňová alebo rekonštituovaná voda alebo odchlórovaná voda z vodovodu	s čistým povrchom, studňová alebo rekonštituovaná voda alebo odchlórovaná voda z vodovodu	s čistým povrchom, studňová alebo rekonštituovaná voda alebo odchlórovaná voda z vodovodu
20. Obdobie pred expozíciou	odporúča sa 7 – 14 dní	odporúča sa 7 – 14 dní	odporúča sa 7 – 14 dní
21. Trvanie expozície chemikálii	21 dní	21 dní	21 dní
22. Biologické ukazovatele	— prežitie — správanie — plodivosť — sek. pohlavné znaky — VTG: — voliteľne histopatológia gonád	— prežitie — správanie — plodivosť — sek. pohlavné znaky — VTG: — voliteľne histopatológia gonád	— prežitie — správanie — plodivosť — VTG: — voliteľne histopatológia gonád
23. Prijateľnosť testu	koncentrácia rozpusteného kyslíka ≥ 60 % saturácie; priemerná teplota 25 ± 2 °C; 90 % prežitie rýb v kontrolných skupinách; merané testovacie koncentrácie v rozsahu 20 % stredných meraných hodnôt pre každú úroveň aplikácie chemikálie	koncentrácia rozpusteného kyslíka ≥ 60 % saturácie; priemerná teplota 25 ± 2 °C; 90 % prežitie rýb v kontrolných skupinách; merané testovacie koncentrácie v rozsahu 20 % stredných meraných hodnôt pre každú úroveň aplikácie chemikálie	koncentrácia rozpusteného kyslíka ≥ 60 % saturácie; priemerná teplota 26 ± 2 °C; 90 % prežitie rýb v kontrolných skupinách; merané testovacie koncentrácie v rozsahu 20 % stredných meraných hodnôt pre každú úroveň aplikácie chemikálie

▼**M7**

Dodatok 3

NIEKTORÉ CHEMICKÉ VLASTNOSTI PRIJATEĽNEJ VODY NA RIEDENIE

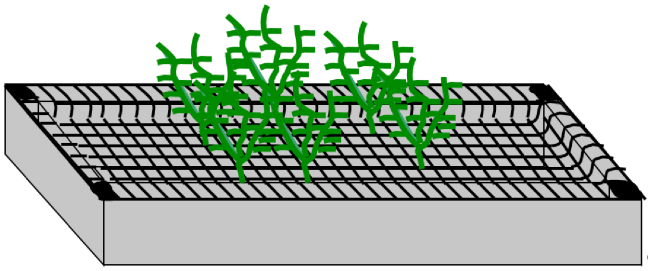
ZLOŽKA	KONCENTRÁCIA
Tuhé častice	< 20 mg/l
Celkový obsah organického uhlíka	< 2 mg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Zvyškový chlór	< 10 µg/l
Celkový obsah organofosfátových pesticídov	< 50 ng/l
Celkový obsah organochlórových pesticídov a polychlórovaných bifenylov	< 50 ng/l
Celkový obsah organického chlóru	< 25 ng/l

▼M7

Dodatok 4A

NERESOVÝ SUBSTRÁT PRE DANIO PRUHOVANÉ

Podložka na neresenie: celosklená nádoba s rozmermi napríklad 22 x 15 x 5,5 cm (dĺžka × šírka × výška) pokrytá odnímateľnou drôtenou mriežkou z nehrdzavejúcej ocele (s veľkosťou ôk 2 mm). Mriežka by mala pokrývať otvor nádoby pod okrajom nádoby.



Na mriežku by sa mal upevniť substrát na neresenie. Rybám by mal poskytovať štruktúru, do ktorej môžu preniknúť. Vhodné sú napríklad umelé akváriové rastliny vyrobené zo zeleného plastového materiálu (pozn.: mala by sa zvážiť možná adsorpcia testovanej chemikálie na plastový materiál). Uvedený plastový materiál by sa mal dostatočne dlho lúhovať v dostatočnom objeme teplej vody, aby sa zabezpečilo, že do vody použitej na testovanie sa neprenesú žiadne chemikálie. V prípade použitia sklených materiálov by sa malo zabezpečiť, aby sa ryby pri intenzívnom pohybe nezranili ani nezakliesnili.

Vzdialenosť medzi podložkou a sklenými stenami by mala byť najmenej 3 cm, aby sa zabezpečilo, že neresenie sa nevykonáva mimo podložky. Vajíčka neresením prenesené na podložku prepadávajú cez mriežku a 45 – 60 minút po spustení osvetlenia z nich možno odobrať vzorky. Priesvitné vajíčka sú nelepivé a ľahko sa počítajú pomocou transverzálneho svetla. Pri použití piatich samíc na testovaciu nádobu možno počet vajíčok do 20 za deň považovať za nízky, od 20 do 100 za stredný a nad 100 za vysoký. Podložka na neresenie by sa mala odstrániť, vajíčka zozbierať a podložka na neresenie vložiť späť do testovacej nádoby, buď čo najneskôr večer, alebo veľmi skoro ráno. Čas, ktorý uplynie do opätovného vloženia, by nemal presiahnuť jednu hodinu, lebo inak stopa substrátu na neresenie môže vyvolať individuálne párenie a neresenie v nezvyčajnom čase. Ak si situácia vyžaduje neskoršie vloženie podložky na neresenie, malo by sa to urobiť najmenej 9 hodín po spustení osvetlenia. V tomto pokročilom dennom čase sa už neresenie nevyvoláva.

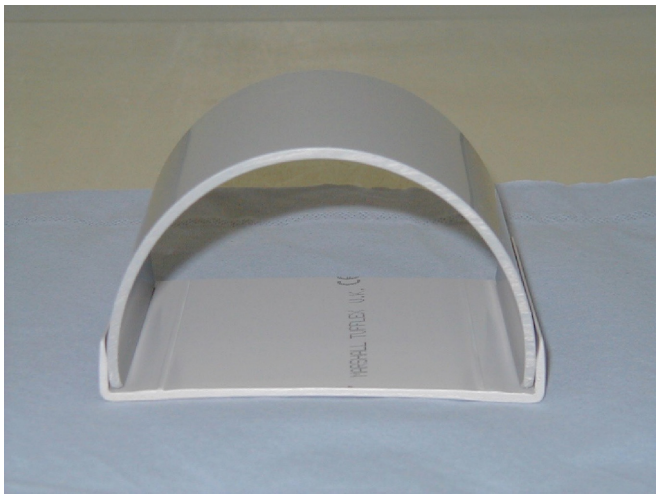
▼M7

Dodatok 4B

NERESOVÝ SUBSTRÁT PRE ČEREBĽU POTOČNÚ

Do každej testovacej komory sa umiestnia dva alebo tri kombinované plastové/keramické/sklené alebo nerezové oblúkové kryty s podložkami na neresenie (napr. 80 mm dlhý sivý polkruhový žľab uložený na podložke so zvýšeným okrajom a s dĺžkou 130 mm) (pozri obrázok). Riadne vyzreté kryty z PVC alebo keramiky sa ukázali ako vhodné miesto pre neresový substrát (Thorpe *et al*, 2007).

Odporúča sa kryty obrúsiť, aby sa zvýšila ich priľnavosť. Podložka by mala byť prekrytá sieťkou tak, aby sa zabránilo rybám v prístupe k padajúcim vajíčkam, pokiaľ nebola preukázaná účinná lepivosť k neresovému substrátu.



Dno je konštruované tak, aby obsahovalo všetky vajíčka, ktoré sa neprilepia k povrchu krytu a spadnú na dno nádoby (alebo vajíčka, ktoré sa uložia priamo na plochú plastovú spodnú časť). Všetky neresové substráty by sa mali pred použitím minimálne 12 hodín lúhovať vo vode na riedenie.

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

Dodatok 5 A

POSÚDENIE SEKUNDÁRNYCH POHLAVNÝCH ZNAKOV ČEREBLE POTOČNEJ NA ZISTENIE URČITÝCH CHEMIKÁLIÍ S ÚČINKOM NA ENDOKRINNÝ SYSTÉM

Prehľad

Medzi potenciálne dôležité znaky fyzického vzhľadu dospelých jedincov čereble potočnej pri testovaní endokrinných disruptorov patrí farba tela (t. j. svetlá/tmavá), vzorovanie (t. j. prítomnosť alebo neprítomnosť zvislých pruhov), tvar tela (t. j. tvar hlavovej a prsnej oblasti, brušná distenzia) a špecializované sekundárne pohlavné znaky (t. j. počet a veľkosť tuberkulov, veľkosť záhlavnej časti chrbta a kladielka).

Tuberkuly sa nachádzajú na hlave (záhlavná časť chrbta) reprodukčne aktívnych samcov čereble potočnej a ich usporiadanie je obvykle dvojstranne symetrické (Jensen *et al*. 2001). Kontrolné skupiny samíc a juvenilné samce a samice nevykazujú vznik žiadnych tuberkulov (Jensen *et al.* 2001). Až osem jednotlivých tuberkulov sa môže nachádzať okolo očí a medzi nozdrami samcov. Najväčší počet tuberkulov, ktoré sú zároveň najväčšie, je umiestnený v dvoch rovnobežných líniách bezprostredne pod nozdrami a nad ústami. V prípade mnohých rýb sa pod dolnou čeľusťou vyskytujú skupiny tuberkulov, pričom tie, ktoré sa nachádzajú najbližšie k ústam sa spravidla vyskytujú ako jediný pár, zatiaľ čo bližšie k brušnej časti to môžu byť skupiny až štyroch tuberkulov. Celkový počet tuberkulov je zriedkavo vyšší ako 30 (v rozsahu 18 – 28; Jensen *et al*. 2001). Prevládajú (z hľadiska počtu) tuberkuly, ktoré tvoria samostatnú, relatívne okrúhlu štruktúru s výškou približne rovnou polomeru. Väčšina reprodukčne aktívnych samcov má takisto prinajmenšom niekoľko tuberkulov, ktoré sú zväčšené a výrazné natoľko, že sú nerozoznateľné ako jednotlivé štruktúry.

Niektoré druhy chemikálií narušujúcich endokrinný systém môžu vyvolávať abnormálny výskyt určitých sekundárnych pohlavných znakov pri živočíchoch opačného pohlavia. Napríklad agonisty androgénových receptorov, ako sú 17α-metyltestosterón alebo 17β-trenbolón, môžu spôsobovať vyvinutie tuberkulov u samíc čereble potočnej (Smith 1974; Ankley *et al.* 2001; 2003), zatiaľ čo agonisty estrogénových receptorov môžu znížiť počet alebo veľkosť tuberkulov u samcov (Miles-Richardson *et al*. 1999; Harries *et al*. 2000).

V ďalšej časti sa uvádza opis charakteristiky tuberkulov čereble potočnej na základe postupov používaných Agentúrou Spojených štátov na ochranu životného prostredia v meste Duluth v štáte Minnesota. Špecifické produkty a/alebo zariadenia možno nahradiť porovnateľnými materiálmi, ktoré sú k dispozícii.

Prehliadanie sa najlepšie vykonáva osvetlenou lupou alebo svetelným stereoskopickým mikroskopom pri 3-násobnom zväčšení. Ryba sa prehliada zo strany chrbta, natočená prednou časťou dopredu (hlavou k prehliadačovi).

— Ryba sa uloží do malej Petriho misky (napr. s priemerom 100 mm), prednou časťou dopredu a brušnou nadol. Hľadáčik sa zameria tak, aby bola možná identifikácia tuberkulov. Ryba sa jemne a pomaly otáča zo strany na stranu a identifikujú sa oblasti tuberkulov. Tuberkuly sa spočítajú a priradí sa im skóre.

— Ryba sa v Petriho miske uloží chrbtovou časťou nadol, prednou dopredu, a vykoná sa prehliadka povrchu brušnej časti hlavy.

— Pozorovania každej ryby by sa mali ukončiť do dvoch minút.

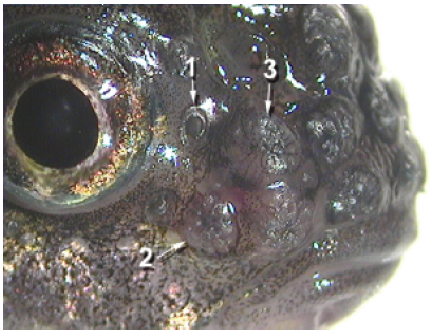
▼M7

Počítanie a klasifikácia tuberkulov

Na posúdenie prítomnosti a vyvinutosti tuberkulov u dospelých jedincov čereble potočnej bolo určených šesť špecifických oblastí. Na mapovanie umiestnenia prítomných tuberkulov a ich množstva bola vypracovaná šablóna (pozri koniec tohto dodatku). Počet tuberkulov sa zaznamenáva a ich veľkosť možno v prípade každého organizmu kvantitatívne klasifikovať takto: 0 – neprítomný, 1 – prítomný, 2 – zväčšený a 3 – výrazný (obrázok 1).

Kategória 0 – neprítomný, nijaký tuberkul nie je prítomný. Kategória 1 – prítomný, identifikovaný akýkoľvek jednotlivý tuberkul, ktorého výška sa skoro rovná jeho polomeru. Kategória 2 – zväčšený, identifikovaný na základe tkaniva, ktoré vzhľadom pripomína hviezdičku, zvyčajne s veľkou radiálnou základňou s drážkami alebo so žliabkami vychádzajúcimi zo stredu. Vrchná časť tuberkula je často viac vrúbkovaná, ale niekedy môže byť čiastočne zaoblená. Kategória 3 – výrazný, zvyčajne pomerne veľký a zaoblený, s menej rozlíšenou štruktúrou. Tieto tuberkuly niekedy spoločne vytvárajú jednotnú masu v jednej oblasti alebo v kombinácii oblastí (B, C a D, ako je opísané v ďalšej časti). Sfarbenie a tvar sú podobné ako v rámci kategórie 2, ale niekedy sú dosť málo rozlíšiteľné. Použitie tohto systému klasifikácie vo všeobecnosti povedie k celkovému skóre < 50 u bežného kontrolného samca s počtom tuberkulov 18 – 20 (Jensen *et al.* 2001).

Obrázok 1



Skutočný počet tuberkulov na tele niektorých rýb môže byť väčší ako počet políčok v šablóne pre určitú klasifikovanú oblasť. V takom prípade je možné vyznačiť ďalšie čísla klasifikácie vpravo alebo vľavo od príslušného políčka. Zobrazenie šablóny preto nemusí byť symetrické. Ďalšou technikou mapovania tuberkulov, ktoré sú umiestnené v pároch alebo spolu vertikálne pozdĺž horizontálnej roviny úst, by mohlo byť dvojité značenie dvoch bodov klasifikácie tuberkulov v jednom políčku.

Mapovanie oblastí:

A – tuberkuly nachádzajúce sa okolo očí. Mapujú sa od chrbtovej časti po brušnú časť okolo predného okraja očí. Na telách dospelých kontrolných samcov je spravidla väčší počet, na telách kontrolných samíc nie sú prítomné, na telách samíc vystavených pôsobeniu androgénov sa vo všeobecnosti nachádzajú v páre (jeden pri každom oku) alebo jeden osamotený.

B-tuberkuly nachádzajúce sa medzi nozdrami (otvormi zmyslových kanálov). Na telách kontrolných samcov sa spravidla vyskytujú v pároch, viac vyvinuté (2 – zväčšené alebo 3 – výrazné). Na telách kontrolných samíc nie sú prítomné, pričom určitý výskyt a stupeň vývoja sa zaznamenal na telách samíc vystavených pôsobeniu androgénov.

C – tuberkuly nachádzajúce sa bezprostredne pred nozdrami, rovnobežne s ústami. Na telách dospelých kontrolných samcov sú vo všeobecnosti zväčšené alebo výrazné. Na telách menej vyvinutých samcov alebo samíc vystavených pôsobeniu androgénov sú prítomné alebo zväčšené.

▼M7

D – tuberkuly nachádzajúce sa rovnobežne pozdĺž línie úst. Na telách kontrolných samcov sa vyvíjajú všeobecne podľa klasifikácie. Na telách kontrolných samíc nie sú prítomné, ale na telách samíc vystavených pôsobeniu androgénov sú prítomné.

E – tuberkuly nachádzajúce sa na dolnej čeľusti, v blízkosti úst, zvyčajne malé a spravidla v pároch. Výskyt je rôzny u kontrolných samcov alebo samcov s aplikovanou chemikáliou a u samíc s aplikovanou chemikáliou.

F – tuberkuly nachádzajúce sa v brušnej časti priľahlej k oblasti E. Spravidla sú malé a vyskytujú sa v pároch. Prítomné sú u kontrolných samcov a u samíc vystavených pôsobeniu androgénov.

ODKAZY

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.

Šablóna tuberkulov:

Identifikácia

Dátum ____

Celkové skóre _____

Číselná klasifikácia

1- prítomný

2- zväčšený

3- výrazný

	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

Dodatok 5B

POSÚDENIE SEKUNDÁRNYCH POHLAVNÝCH ZNAKOV RYŽOVNÍČKY JAPONSKEJ PRI ZISŤOVANÍ URČITÝCH CHEMIKÁLIÍ S ÚČINKOM NA ENDOKRINNÝ SYSTÉM

Ďalej sa uvádza opis merania papilárnych výbežkov ([1]), ktoré sú sekundárnymi pohlavnými znakmi ryžovníčky japonskej (*Oryzias latipes*).

1. Po vyrezaní pečene (dodatok 6) sa telo vloží do kónickej skúmavky, ktorá obsahuje približne 10 ml 10 % neutrálneho tlmeného formalínu (smerom hore: hlava, smerom dolu: chvost). Ak sa gonáda fixuje inak než 10 % neutrálnym tlmeným formalínom, telo treba rozrezať žiletkou priečnym rezom medzi prednou časťou análnej plutvy a análnym otvorom, pričom treba dbať na to, aby sa nenarušil gonopór ani samotná gonáda (obrázok 3). Kraniálna strana tela ryby sa umiestni do fixačného roztoku na konzervovanie gonád a chvostová strana tela ryby do 10 % neutrálneho tlmeného formalínu, ako už bolo opísané.

2. Po vložení tela ryby do 10 % neutrálneho tlmeného formalínu sa uchopí predná časť análnej plutvy pinzetou a ohne sa približne na 30 sekúnd, aby sa plutva roztiahla. Pri uchopení análnej plutvy pinzetou uchopte opatrne niekoľko lúčov plutvy v prednej časti, aby sa papilárne výbežky nepoškodili.

3. Po roztiahnutí análnej plutvy približne na 30 sekúnd sa telo ryby uloží do 10 % neutrálneho tlmeného formalínu pri izbovej teplote až do začiatku merania papilárnych výbežkov (fixovanie pred meraním by malo trvať najmenej 24 hodín).

Meranie

1. Po fixovaní tela ryby v 10 % neutrálnom tlmenom formalíne najmenej počas 24 hodín sa telo ryby vyberie z kónickej skúmavky a formalín sa otrie filtračným papierom (alebo papierovou utierkou).

2. Ryba sa položí brušnou stranou nahor. Potom sa malými pitevnými nožnicami opatrne odreže análna plutva (odporúča sa odrezať análnu plutvu aj s malou časťou opornej kosti pterygiophore).

3. Oddelená análna plutva sa pinzetou uchopí za prednú časť a položí sa na podložné sklíčko s niekoľkými kvapkami vody. Potom sa plutva zakryje krycím sklíčkom. Pri uchopení análnej plutvy pinzetou treba dávať pozor, aby sa papilárne výbežky nepoškodili.

4. Počet spojených platničiek s papilárnymi výbežkami sa určí prostredníctvom počítacej komôrky pod biologickým mikroskopom (stojanovým alebo inverzným). Papilárne výbežky sa vykazujú, keď je na zadnom okraji spojenej platničky viditeľné malé zoskupenie výbežkov. Do pracovného hárku sa zapíše počet spojených platničiek s papilárnymi výbežkami na každom lúči

([1]) Papilárne výbežky sa spravidla vyskytujú len u dospelých samcov a nachádzajú sa na lúčoch análnej plutvy od druhého po siedmy alebo ôsmy, počítajúc od zadného konca análnej plutvy (obrázok 1 a 2). Výbežky sa však len zriedka vyskytujú na prvom lúči od zadného konca análnej plutvy. Tento štandardný operačný postup sa vzťahuje na meranie výbežkov na prvom lúči plutvy (poradové číslo lúča análnej plutvy sa v rámci tohto štandardného operačného postupu vzťahuje na poradie od zadného konca análnej plutvy).

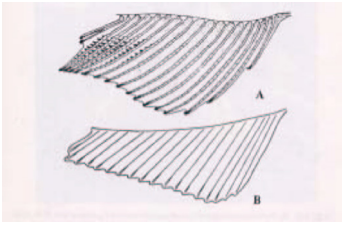
▼M7

plutvy (napr. prvý lúč plutvy: 0, druhý lúč plutvy: 10, tretí lúč plutvy: 12 atď.) a súčet týchto počtov sa uvedie do tabuľky programu Excel podľa jednotlivých rýb. V prípade potreby sa urobí fotografia análnej plutvy a počet spojených platničiek s papilárnymi výbežkami sa určí z tejto fotografie.

5. Po uskutočnení merania sa análna plutva vloží do kónickej skúmavky opísanej v bode 1 a odloží sa.

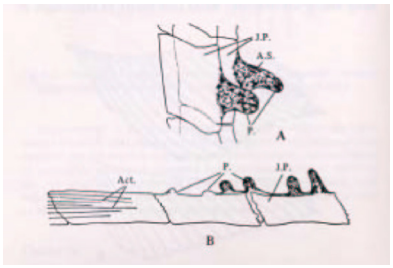
Obr. 1.

Obrázok znázorňujúci rozdiely medzi pohlaviami, pokiaľ ide o tvar a veľkosť análnej plutvy. A, samec; B, samica. 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.



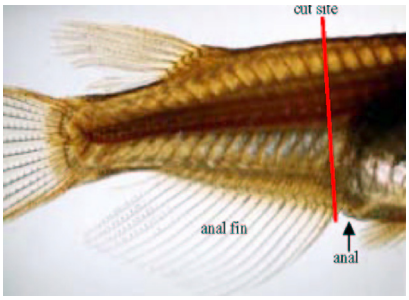
Obr. 2.

A: Výbežky na spojených platničkách lúča análnej plutvy. J.P.: spojená platnička; A.S.: axiálny priestor; P.: výbežok. B: Distálny koniec lúča plutvy. Na úplnom konci lúča plutvy sú actinotrichia (Act.). Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209 – 218.



Obr. 3.

Fotografia tela ryby, ktorá znázorňuje miesto rezu v prípade, keď sa gonáda fixuje v inom fixačnom roztoku ako 10 % neutrálnom tlmenom formalíne. V takom prípade sa telo rozreže žiletkou medzi prednou časťou análnej plutvy a análnym otvorom (červená čiara), hlavová strana tela ryby sa vloží do fixačného roztoku na konzervovanie gonád a chvostová strana tela ryby sa vloží do 10 % neutrálneho tlmeného formalínu.



▼M7

Dodatok 6

ODPORÚČANÉ POSTUPY ODBERU VZORIEK NA ANALÝZU VITELOGENÍNU

Malo by sa dbať na to, aby sa zabránilo krížovej kontaminácii medzi vzorkami VTG samcov a samíc.

Postup 1A: Čerebľa potočná, odber krvi z chvostovej žily/tepny

Po anestetizovaní sa chvostový pedunkulus čiastočne oddelí čepeľou skalpela a krv z chvostovej tepny/žily sa odoberie heparinizovanou mikrohematokritovou kapilárou. Po odobratí krvi sa rýchlo izoluje plazma odstreďovaním počas 3 minút pri 15 000 *g* (alebo alternatívne počas 10 minút pri 15 000 *g* a teplote 4 °C). V prípade potreby možno po odstredení stanoviť percentuálnu hodnotu hematokritu. Plazma sa odoberie z mikrohematokritovej kapiláry, vloží sa do skúmavky na odstreďovanie spolu s 0,13 jednotky aprotinínu (inhibítor proteázy) a uchová sa pri teplote – 80 °C, kým nebude možné stanoviť VTG. V závislosti od veľkosti čereble potočnej (závisí od pohlavia) sa objem plazmy, ktorú možno odobrať, vo všeobecnosti pohybuje v rozsahu 5 – 60 µl na jednu rybu (Jensen *et al.* 2001).

Postup 1B: Čerebľa potočná, odber krvi zo srdca

Alternatívne možno krv odobrať srdcovou punkciou heparinizovanou striekačkou (1 000 jednotiek heparínu na ml). Krv sa preloží do skúmaviek Eppendorf (uložených na ľade) a potom sa odstredí (5 minút pri 7 000 *g* a izbovej teplote). Plazma by sa mala preložiť do čistých skúmaviek Eppendorf (v alikvotných množstvách, ak to objem plazmy umožňuje) a rýchlo zmraziť pri – 80 °C, kým sa nevykoná analýza (Panter *et al.*, 1998).

Postup 2 A: Ryžovníčka japonská, vyrezanie pečene

Vybratie testovanej ryby zo skúšobnej komory

1. Testovaná ryba by sa mala vybrať zo skúšobnej komory malým podberákom. Treba dávať pozor, aby testovaná ryba nespadla do inej skúšobnej komory.

2. Testované ryby by sa zo skupín mali v zásade vyberať v tomto poradí: kontrolná skupina, kontrolná skupina s rozpúšťadlom (ak je to vhodné), skupina s najnižšou koncentráciou, skupina so strednou koncentráciou, skupina s najvyššou koncentráciou a pozitívna kontrolná skupina. Okrem toho by sa mali z jednej skúšobnej komory najskôr vybrať všetci samci, až potom zostávajúce samice.

3. Pohlavie každej testovanej ryby sa určí na základe vonkajších sekundárnych pohlavných znakov (napr. tvaru análnej plutvy).

4. Testovaná ryba sa vloží do prepravného kontajnera a premiestni sa na pracovisko určené na vyrezanie pečene. Treba skontrolovať správnosť údajov na štítkoch na skúšobnej komore a prepravnom kontajneri, aby sa potvrdilo, že počet rýb, ktoré sa vybrali zo skúšobnej komory, a počet rýb, ktoré v skúšobnej komore zostali, je v súlade s očakávaním.

5. Ak pohlavie rýb nemožno určiť na základe ich vonkajšieho vzhľadu, vyberú sa všetky ryby zo skúšobnej komory. V tom prípade by sa pohlavie malo určiť na základe pozorovania gonád alebo sekundárnych pohlavných znakov stereoskopickým mikroskopom.

Vyrezanie pečene

1. Testovaná ryba sa preloží z prepravného kontajnera do anestetického roztoku malým podberákom.

▼M7

2. Po anestetizovaní sa testovaná ryba pinzetou (spotrebného druhu) uloží na filtračný papier (alebo na papierovú utierku). Rybu treba uchopiť pinzetou za boky hlavy, aby sa zabránilo zlomeniu chvosta.

3. Voda z povrchu testovanej ryby sa utrie filtračným papierom (alebo papierovou utierkou).

4. Ryba sa položí brušnou stranou nahor. Potom sa pitevnými nožnicami urobí malý priečny zárez medzi časťou brucha v blízkosti hlavy a strednou časťou brucha.

5. Pitevné nožnice sa vložia do malého rezu a brucho sa rozstrihne pozdĺž stredovej línie od zadného bodu žiabrového krytu po kraniálnu stranu análneho otvoru. Treba dávať pozor, aby sa pitevné nožnice nevložili príliš hlboko a nedošlo k poškodeniu pečene a gonád.

6. Ďalšie operácie sa vykonávajú pod stereoskopickým mikroskopom.

7. Testovaná ryba sa položí brušnou stranou nahor na papierovú utierku (použiť možno aj sklenenú Petriho misku alebo podložné sklíčko).

8. Presnou pinzetou sa rozšíria steny brušnej dutiny a vyberú sa vnútorné orgány. Je takisto prípustné, aby sa v prípade potreby vnútorné orgány vybrali po odstránení jednej bočnej steny brušnej dutiny.

9. Ďalšou presnou pinzetou sa odhalí spojená časť pečene a žlčníka. Potom sa uchopí žlčovod a žlčník sa odreže. Treba dávať pozor, aby sa žlčník nepoškodil.

10. Uchopí sa pažerák a rovnako sa od pečene oddelí tráviaci trakt. Treba dávať pozor, aby nedošlo k úniku obsahu tráviaceho traktu. Kaudálny tráviaci trakt sa oddelí od análneho otvoru a odstráni z brušnej dutiny.

11. Z okrajových častí pečene sa odreže tuková hmota a iné tkanivá. Treba dávať pozor, aby nedošlo k poškrabaniu pečene.

12. Pečeň sa uchopí presnou pinzetou za oblasť brány a vyberie sa z brušnej dutiny.

13. Pečeň sa uloží na podložné sklíčko. V prípade potreby sa presnou pinzetou odstráni z povrchu pečene akýkoľvek ďalší tuk a cudzie tkanivo (napr. výstelka brucha).

14. Hmotnosť pečene sa meria elektronickými analytickými váhami spolu s 1,5 ml mikroskúmavkou predstavujúcou taru. Hodnota sa zaznamená do pracovného hárku (odčítava sa na 0,1 mg). Identifikačné údaje na štítku mikroskúmavky sa potvrdia.

15. Mikroskúmavka obsahujúca pečeň sa uzavrie a uloží do chladiaceho boxu (alebo mraziaceho boxu).

16. Po vyrezaní jednej pečene treba pitevné nástroje vyčistiť, alebo ich nahradiť čistými.

▼M7

17. Uvedeným postupom sa pečeň odoberie zo všetkých rýb v prepravnom kontajneri.

18. Po vyrezaní pečene zo všetkých rýb v prepravnom kontajneri (t. j. všetkých samcov alebo samíc v skúšobnej komore) sa všetky vzorky pečene uložia do stojanu na skúmavky s identifikačným štítkom a vložia sa do mrazničky. Ak sa pečeň dáva na predbežnú úpravu krátko po vyrezaní, vzorky sa na ďalšie pracovisko prenášajú v chladiacom (alebo mraziacom) boxe.

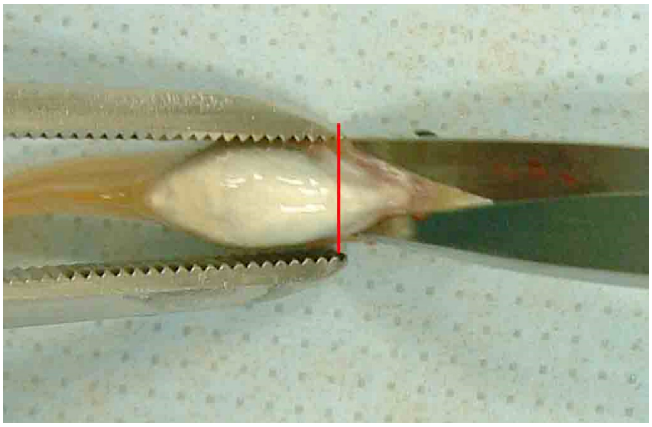
Po vyrezaní pečene je telo ryby k dispozícii na histológiu gonád a meranie sekundárnych pohlavných znakov.

Vzorka

Ak sa vzorky pečene nepoužijú na predbežnú úpravu krátko po vyrezaní z testovanej ryby, musia sa skladovať pri teplote ≤ – 70 °C.

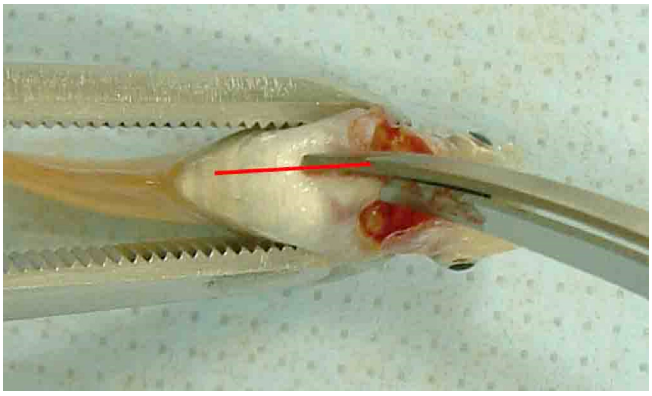
Obrázok 1

Nožnicami sa urobí rez tesne pred prsnými plutvami.



Obrázok 2

Stredová línia brucha sa nožnicami rozstrihne k bodu približne 2 mm od kraniálnej strany análneho otvoru.



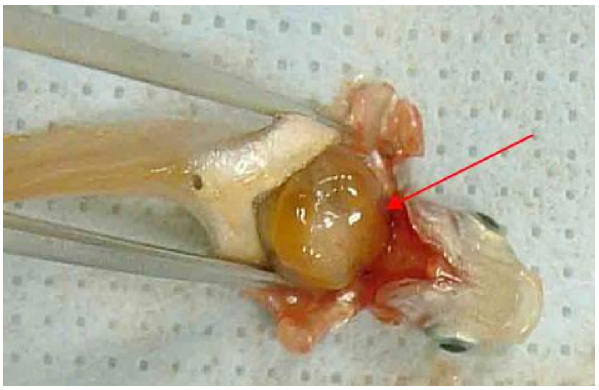
▼M7

Obrázok 3

Pomocou pinzety sa rozšíria steny brušnej dutiny a odhalí sa pečeň a ďalšie vnútorné orgány.

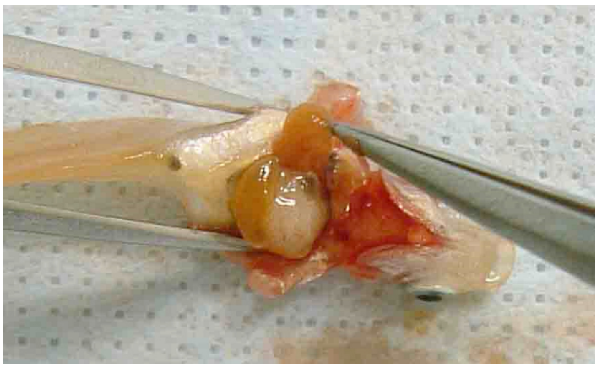
(Alternatívne možno steny brušnej dutiny zboku pripevniť).

Šípka ukazuje na pečeň.



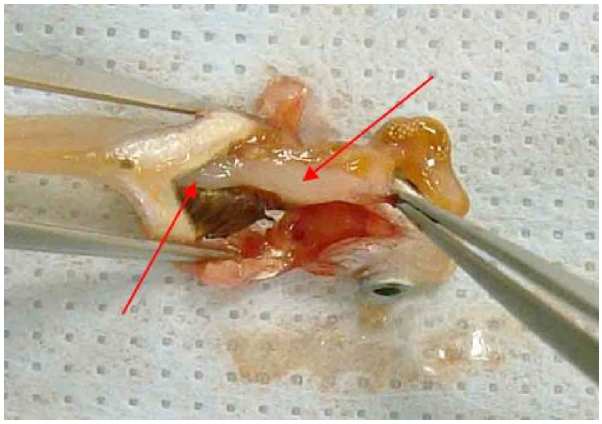
Obrázok 4

Pečeň sa priamo vyreže a pinzetou vyberie.



Obrázok 5

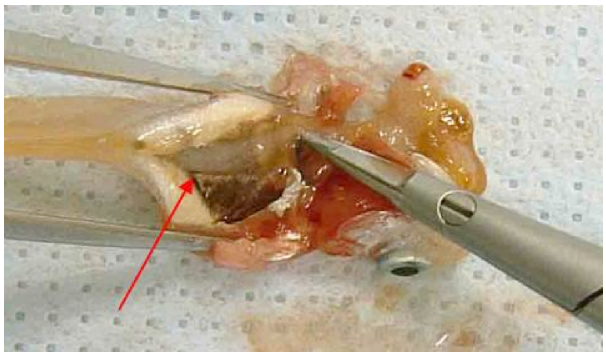
Pinzetou sa črevá jemne odtiahnu.



▼M7

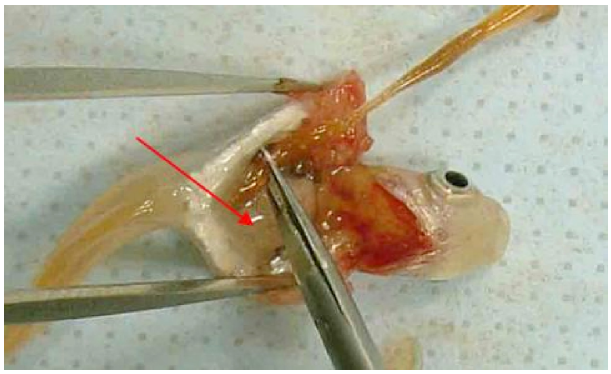
Obrázok 6

Obidva konce čriev a akékoľvek mezenteriálne pripojenia sa nožnicami oddelia.



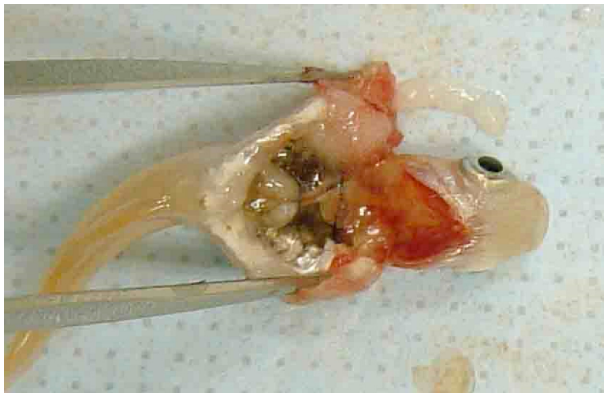
Obrázok 7 (samica)

Postup je v prípade samíc rovnaký.



Obrázok 8

Ukončený postup.



▼M7

Postup 2 B: Ryžovníčka japonská (*Oryzias latipes*), predbežná úprava pečene na analýzu vitelogenínu

Zo súpravy ELISA sa vyberie fľaša tlmivého roztoku homogenátu a ochladí sa drveným ľadom (teplota roztoku: ≤ 4 °C). Ak sa použije tlmivý roztok homogenátu zo systému EnBio ELISA, nechá sa rozmraziť pri izbovej teplote a potom sa fľaša ochladí drveným ľadom.

Vypočíta sa objem tlmivého roztoku homogenátu pre pečeň na základe jej hmotnosti (pridá sa 50 µl tlmivého roztoku homogenátu na 1 mg hmotnosti pečene). Napríklad ak je hmotnosť pečene 4,5 mg, objem tlmivého roztoku homogenátu pre pečeň je 225 µl. Spíše sa zoznam objemov tlmivého roztoku homogenátu pre všetky pečene.

Príprava pečene na predbežnú úpravu

1. 1,5 ml mikroskúmavka s pečeňou sa z mrazničky vyberie tesne pred predbežnou úpravou.

2. Predbežná úprava pečene samcov by mala predchádzať predbežnej úprave pečene samíc, aby sa zabránilo kontaminácii vitelogenínom. Okrem toho by sa predbežná úprava skupín mala vykonávať v tomto poradí: kontrolná skupina, kontrolná skupina s rozpúšťadlom (ak je to vhodné), skupina s najnižšou koncentráciou, skupina so strednou koncentráciou, skupina s najvyššou koncentráciou a pozitívna kontrolná skupina.

3. Počet 1,5 ml mikroskúmaviek so vzorkami pečene, ktoré sa v danom čase z mrazničky vyberú, by nemal prekročiť počet, ktorý možno v danom čase odstreďovať.

4. 1,5 ml mikroskúmavky so vzorkami pečene sa uložia do mraziaceho boxu v poradí podľa čísel vzoriek (pečeň netreba rozmrazovať).

Postup predbežnej úpravy

1. Pridanie tlmivého roztoku homogenátu

   Podľa zoznamu sa zistí objem tlmivého roztoku homogenátu, ktorý sa má použiť pre konkrétnu vzorku pečene, a mikropipeta sa nastaví na príslušný objem (rozsah objemu: 100 – 1 000 µl). Na mikropipetu sa nasadí čistá špička.

   Tlmivý roztok homogenátu sa odoberie z reakčnej banky a pridá sa do 1,5 ml mikroskúmavky s pečeňou.

   Uvedeným postupom sa tlmivý roztok homogenátu pridá do všetkých 1,5 ml mikroskúmaviek s pečeňou. Špičku mikropipety netreba meniť za novú. Ak je však špička kontaminovaná, alebo by mohla byť kontaminovaná, mala by sa vymeniť.

2. Homogenizácia pečene

   — Na homogenizátor na mikroskúmavky sa nasadí nový piest na homogenizáciu.

   — Piest sa vloží do 1,5 ml mikroskúmavky. Homogenizátor mikroskúmaviek sa drží tak, aby bola pečeň pritlačená medzi povrch piestu a vnútornú stenu 1,5 ml mikroskúmavky.

   — Homogenizátor sa uvedie do prevádzky na 10 – 20 sekúnd. Počas prevádzky sa 1,5 ml mikroskúmavka chladí drveným ľadom.

▼M7

— Piest sa vytiahne z 1,5 ml mikroskúmavky a nechá sa v pokoji približne 10 sekúnd. Potom sa vykoná vizuálna kontrola stavu suspenzie.

— Ak sa v suspenzii vidno kúsky pečene, operácie 3 a 4 sa zopakujú, tak, aby sa pripravil uspokojivý homogenát pečene.

— Suspendovaný homogenát pečene sa chladí v mraziacom boxe až do odstredenia.

— Pre každý homogenát sa piest vymení za nový.

— Uvedeným postupom sa všetky pečene zhomogenizujú s homogenizačným tlmivým roztokom.

3. Odstreďovanie suspendovaného homogenátu pečene

— Treba overiť, či je teplota v chladenej komore centrifúgy ≤ 5 °C.

— Do chladenej centrifúgy sa vložia 1,5 ml mikroskúmavky so suspendovaným homogenátom pečene (v prípade potreby sa upraví rovnováha).

— Suspendovaný homogenát pečene sa odstreďuje 10 minút pri 13 000 *g* a teplote ≤ 5 °C. Ak sú však supernatanty dostatočne oddelené, možno odstredivú silu a čas odstreďovania upraviť podľa potreby.

— Po odstredení sa skontroluje, či sú supernatanty primerane oddelené (povrchová vrstva: tuk, stredná vrstva: supernatant, spodná vrstva: tkanivo pečene). Ak oddelenie nie je primerané, suspenzia sa opäť odstredí za tých istých podmienok.

— Všetky vzorky sa vyberú z chladenej centrifúgy a uložia sa v poradí podľa čísel vzoriek v mraziacom boxe. Treba dať pozor, aby vrstvy oddelené po odstreďovaní znovu neprešli do suspenzie.

4. Odber supernatantu

— Do stojana na skúmavky sa vložia štyri 0,5 ml mikroskúmavky na uloženie supernatantu.

— Z každého supernatantu (oddeleného ako stredná vrstva) sa mikropipetou odoberie 30 µl a prenesie sa do jednej 0,5 ml mikroskúmavky. Treba dať pozor na to, aby sa neodobral tuk z povrchovej vrstvy alebo tkanivo pečene zo spodnej vrstvy.

— Supernatant sa odoberie a rozdelí do dvoch ďalších 0,5 ml mikroskúmaviek rovnako, ako už bolo uvedené.

— Zvyšok supernatantu sa odoberie mikropipetou (ak je to možné: ≥ 100 µl). Prenesie sa do poslednej 0,5 ml mikroskúmavky. Treba dať pozor na to, aby sa neodobral tuk z povrchovej vrstvy alebo tkanivo pečene zo spodnej vrstvy.

— 0,5 ml mikroskúmavka sa uzavrie a na štítok sa napíše objem supernatantu. Bezprostredne potom sa mikroskúmavky ochladia v mraziacom boxe.

— Špička mikropipety sa vymení za novú pre každý supernatant. Ak na špičku prilne veľké množstvo tuku, treba ju ihneď vymeniť za novú, aby sa zabránilo kontaminácii pečeňového extraktu tukom.

▼M7

— Všetky odstredené supernatanty sa uvedeným postupom prenesú do štyroch 0,5 ml mikroskúmaviek.

— Po prenesení supernatantu do 0,5 ml mikroskúmaviek sa tieto uložia do stojana s identifikačným štítkom a potom sa okamžite zmrazia v mrazničke. Ak sa koncentrácie VTG merajú ihneď po predbežnej úprave, jedna 0,5 ml mikroskúmavka (s 30 µl supernatantu) sa vloží do chladeného stojanu na skúmavky a potom sa premiestni na pracovisko, kde sa vykonáva test ELISA. V takom prípade sa zostávajúce mikroskúmavky uložia do stojanov a zmrazia v mrazničke.

— Po odbere supernatantu sa zvyšok primerane zlikviduje.

Uskladnenie vzoriek

0,5 ml mikroskúmavky so supernatantom homogenátu pečene sa udržiavajú pri teplote ≤ – 70 °C, až kým sa nepoužijú na test ELISA.

Postup 3 A: Danio pruhované, odber krvi z chvostovej žily/tepny

Bezprostredne po anestéze sa chvostový pedunkulus priečne nareže a heparinizovanou mikrohematokritovou kapilárou sa odoberie krv z chvostovej tepny/žily. Objem krvi sa pohybuje v rozsahu od 5 do 15 mikrolitrov v závislosti od veľkosti rýb. Do mikrokapiláry sa pridá rovnaký objem tlmivého roztoku aprotinínu (6 mikrogramov/ml vo fosfátovom tlmivom fyziologickom roztoku) a z krvi sa odstreďovaním oddelí plazma (5 minút pri 600 g). Plazma sa odoberie do testovacích skúmaviek a udržiava sa pri teplote –20 °C, až kým sa nezačne analyzovať na prítomnosť VTG alebo iných skúmaných proteínov.

Postup 3 B: Danio pruhované, odber krvi srdcovou punkciou

S cieľom zabrániť zrážaniu krvi a degradácii proteínov sa vzorky odoberajú do fosfátového tlmivého fyziologického roztoku (PBS) obsahujúceho heparín (1 000 jednotiek/ml) a inhibítor proteázy aprotinín (2 TIU/ml). Ako zložky tlmivého roztoku sa odporúčajú heparín, amóniová soľ a lyofilizovaný aprotinín. Na odber vzoriek krvi sa odporúča striekačka (1ml) s pevnou tenkou ihlou (napr. Braun Omnikan-F). Striekačka by sa mala vopred naplniť tlmivým roztokom (približne 100 mikrolitrov), aby sa úplne eluovali malé objemy krvi z každej ryby. Vzorky krvi sa odoberajú srdcovou punkciou. Ryba by sa mala najskôr anestetizovať s MS-222 (100 mg/l). Správna hladina anestézie umožňuje používateľovi rozpoznať tlkot srdca dania pruhovaného. Pri punkcii srdca treba držať piest striekačky pod miernym tlakom. Objem krvi, ktorú možno odobrať, sa pohybuje v rozsahu 20 – 40 mikrolitrov. Po srdcovej punkcii by sa mala testovacia skúmavka naplniť zmesou krvi a tlmivého roztoku. Z krvi sa odstreďovaním oddelí plazma (20 minút pri 5 000 g) a mala by sa udržiavať pri teplote –80 °C, až kým sa nezačne analyzovať.

Postup 3C: Štandardný operačný postup: Danio pruhované, homogenizácia hlavy a chvosta

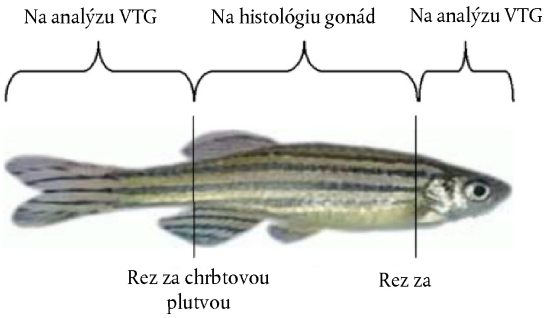
1. Ryba sa anestetizuje a usmrtí v súlade s opisom testu.

2. Hlava a chvost ryby sa odrežú podľa obrázka 1.

Dôležité: *Všetky pitevné nástroje a doska na rezanie by sa mali medzi narábaním s jednotlivými rybami riadne opláchnuť a vyčistiť (napr. 96 % etanolom), aby sa zabránilo „vitelogenínovému znečisteniu“ neindukovaných samcov od samíc alebo indukovaných samcov*.

▼**M7**

Obrázok 1



3. Hlava a chvost každej ryby sa spoločne odvážia s presnosťou na miligramy.

4. Po odvážení sa tieto časti vložia do vhodných skúmaviek (napr. 1,5 ml skúmaviek Eppendorf) a zmrazia sa pri teplote –80 °C až do homogenizácie, alebo sa priamo homogenizujú na ľade dvomi plastovými piestami. (Možno použiť aj iné metódy, ak sa vykonávajú na ľade a výsledkom je homogénna hmota). Dôležité: *Skúmavky by mali riadne očíslovať tak, aby bolo možné hlavu a chvost ryby priradiť k príslušnej časti tela, ktorá sa použije na histológiu gonád.*

5. Keď sa dosiahne homogénna hmota, pridá sa ľadový **homogenizačný tlmivý roztok** ([1]) predstavujúci štvornásobok hmotnosti tkaniva. Zmes sa ďalej spracúva piestami, kým nie je homogénna. Dôležitá poznámka: Pre každú jednotlivú rybu sa používajú *nové piesty.*

6. Vzorky sa uložia na ľad až do odstreďovania pri teplote **4 °C** pri 50 000 *g* počas 30 minút.

7. Na vloženie dávok 20 µl supernatantu do **najmenej dvoch** skúmaviek sa použije pipeta. Špička pipety sa prestrčí pod vrstvu tuku na povrchu a opatrne sa odsaje supernatant bez tukových alebo tuhých frakcií.

8. Skúmavky sa pred použitím skladujú pri teplote – 80 °C.

([1]) Homogenizačný tlmivý roztok:
— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % zmes inhibítora proteázy (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl zmes inhibítora proteázy.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) napríklad od Bie & Berntsen, Dánsko.
— zmes inhibítora proteázy: od Sigma (pre tkanivá cicavcov), číslo výrobku P 8340.
POZNÁMKA: Homogenizačný tlmivý roztok by sa mal použiť v deň, keď bol pripravený. Počas použitia musí byť uložený na ľade.

▼M7

Dodatok 7

VZORKY OBOHATENÉ VITELOGENÍNOM A REFERENČNÁ LÁTKA-ŠTANDARD

Každý deň, keď sa vykonávajú testy na zistenie VTG, sa bude analyzovať obohatená vzorka pripravená s „inter-assay“ referenčným štandardom. VTG použitý na prípravu referenčnej látky-štandardu musí pochádzať z inej dávky než VTG použitý na prípravu kalibračných štandardov pre vykonávaný test.

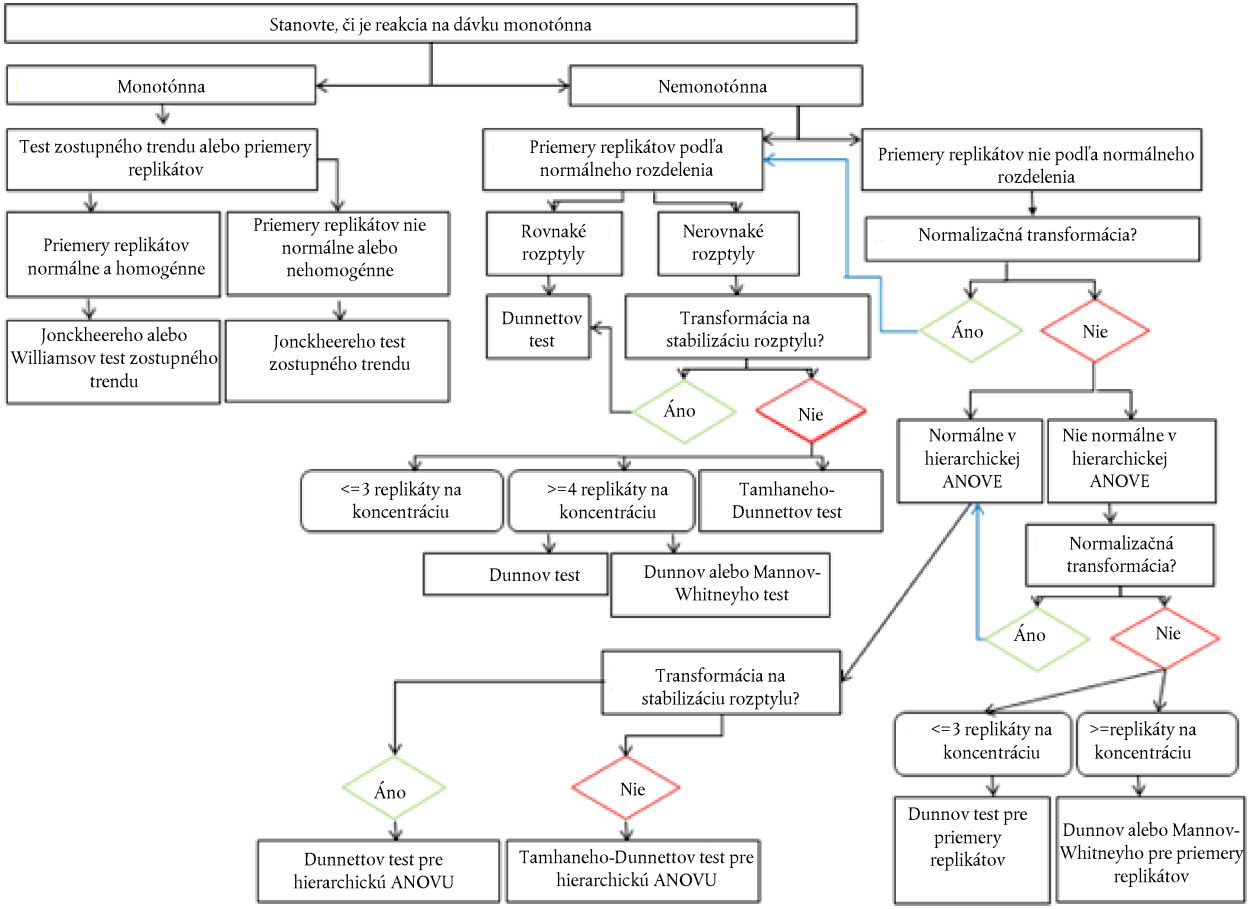
Obohatená vzorka sa pripraví pridaním známeho množstva štandardu do vzorky plazmy kontrolných samcov. Vzorka sa obohatí tak, aby sa dosiahla koncentrácia VTG 10- až 100-násobná oproti očakávanej koncentrácii vo vzorke kontrolných samcov rýb. Vzorka plazmy kontrolných samcov, ktorá sa obohatí, môže pochádzať od jednej ryby alebo môže byť zmesou od viacerých rýb.

Čiastková vzorka neobohatenej vzorky plazmy kontrolných samcov sa bude analyzovať najmenej v dvoch duplicitných súboroch. Obohatená vzorka sa bude takisto analyzovať najmenej v dvoch duplicitných súboroch. Priemerné množstvo vitelogenínu v dvoch neobohatených vzorkách plazmy kontrolných samcov sa pridá k vypočítanému množstvu VTG pridanému na obohatenie vzoriek s cieľom stanoviť očakávanú koncentráciu. Spolu s výsledkami z každého súboru testov vykonaných v daný deň sa uvádza pomer tejto očakávanej koncentrácie a nameranej koncentrácie.

▼M7

Dodatok 8

SCHÉMA ROZHODOVANIA PRE ŠTATISTICKÚ ANALÝZU



▼M7

C.49. TEST AKÚTNEJ TOXICITY NA RYBÍCH EMBRYÁCH (FET)

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda (ďalej len „TM“) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (ďalej len „TG“) 236 (2013). Opisuje test akútnej toxicity na rybích embryách (ďalej len „FET“) dania pruhovaného (*Danio rerio*). Tento test je určený na stanovenie akútnej toxicity chemikálií pre embryonálne štádiá rýb. Test FET je založený na štúdiách a validačných činnostiach vykonaných na daniu pruhovanom (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14). Test FET sa úspešne uplatňuje na širokú škálu chemikálií s rôznym spôsobom účinku, rozpustnosťou, prchavosťou a hydrofóbnosťou (zhrnutých v literatúre pod číslom 15 a 16).

2. Definície použité v tejto testovacej metóde sú uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

3. Čerstvo oplodnené vajíčka dania pruhovaného sa vystavia testovanej chemikálii počas obdobia 96 hodín. Každých 24 hodín sa zaznamenajú až štyri koncové pozorovania ako ukazovatele letality (6): i) koagulácia oplodnených vajíčok; ii) nevytvorenie somitov; iii) neoddelenie chvostového pupeňa od žĺtkového vaku a iv) neprítomnosť srdcového tepu. Na konci obdobia expozície sa stanoví akútna toxicita na základe pozitívneho výsledku v ktoromkoľvek zo štyroch zaznamenaných koncových pozorovaní a vypočíta sa hodnota LC_{50}.

ÚVODNÉ ÚVAHY

4. Medzi užitočné informácie o špecifických vlastnostiach látky patrí štruktúrny vzorec, molekulová hmotnosť, čistota, stabilita vo vode a na svetle, hodnoty pK_a a K_{ow}, rozpustnosť vo vode a tlak pary, ako aj výsledky testu ľahkej biodegradovateľnosti [TM C.4 (17) alebo TM C.29 (18)]. Rozpustnosť a tlak pary možno použiť na výpočet Henryho konštanty, ktorá bude udávať, či môže dôjsť k elimináciám v dôsledku vyparovania testovanej chemikálie. Na kvantifikáciu látky v testovacích roztokoch je potrebné mať spoľahlivú analytickú metódu so známou a uvedenou presnosťou a detekčným limitom.

5. Ak sa táto testovacia metóda používa na testovanie zmesi, jej zloženie by sa malo stanoviť čo najpodrobnejšie, napr. na základe chemickej identity jej zložiek, ich kvantitatívneho výskytu a špecifických vlastností (pozri bod 4). Pred použitím tejto testovacej metódy na regulačné testovanie zmesi treba zvážiť, či poskytne prijateľné výsledky na určené regulačné účely.

6. Pokiaľ ide o látky, ktoré môžu byť aktivované prostredníctvom metabolizmu, existujú dôkazy, že embryá dania pruhovaného majú biotransformačné schopnosti (19)(20)(21)(22). Metabolická kapacita embryonálnych rýb však nie je vždy podobná metabolickej kapacite mladých alebo dospelých rýb. Napríklad sa v teste FET nezistil protoxikant alylalkohol (9). Preto ak existujú náznaky, že metabolity alebo iné relevantné produkty transformácie môžu byť toxickejšie než materská zlúčenina, odporúča sa vykonať test aj s týmito metabolitmi/produktmi transformácie a aj tieto výsledky použiť pri formulovaní záverov o toxicite testovanej chemikálie, prípadne vykonať iný test, v ktorom sa podrobnejšie prihliada na metabolizmus.

7. V prípade látok s molekulovou hmotnosťou ≥ 3kDa, veľmi objemnou molekulárnou štruktúrou a látok spôsobujúcich oneskorenie liahnutia, ktoré by mohli zabrániť expozícii po vyliahnutí alebo ju znížiť, sa vzhľadom na obmedzenú biologickú dostupnosť látky neočakáva citlivosť embryí, takže môžu byť vhodnejšie iné testy toxicity.

▼M7

PLATNOSŤ TESTU

8. Na účely validnosti výsledkov platia tieto kritériá:

a) celková miera oplodnenia všetkých odobratých vajíčok v testovanej vzorke by mala byť ≥ 70 %;

b) teplota vody v testovacích komorách by sa počas celého testu mala udržiavať na 26 ± 1 °C;

c) celkové prežitie embryí v negatívnej kontrole (voda na riedenie), prípadne v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla by malo byť ≥ 90 % až do konca 96-hodinovej expozície;

d) expozícia v pozitívnej kontrole (napr. 4,0 mg/l 3,4-dichlóranilínu pre danio pruhované) by mala viesť k minimálnej úmrtnosti 30 % na konci 96-hodinovej expozície;

e) miera liahnutia v negatívnej kontrole (prípadne v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla) by mala byť ≥ 80 % na konci 96-hodinovej expozície;

f) na konci 96-hodinovej expozície by mala byť koncentrácia rozpusteného kyslíka v negatívnej kontrole a najvyššia testovaná koncentrácia ≥ 80 % nasýtenia.

OPIS METÓDY

9. Prehľad odporúčaných podmienok chovu a testovacích podmienok sa uvádza v dodatku 2.

Testovacie vybavenie

10. Potrebné je toto vybavenie:

a) akváriá z chemicky inertného materiálu (napr. zo skla) s vhodným objemom vzhľadom na odporúčanú veľkosť násady (pozri časť „Chov generačných rýb“, bod 14);

b) invertovaný mikroskop a/alebo binokulárny mikroskop s možnosťou aspoň 80-násobného zväčšenia. Ak v miestnosti použitej na zaznamenávanie pozorovaní nemožno dosiahnuť teplotu 26 ± 1 °C, je nutné použiť podstavec s krížovým posunom s regulovanou teplotou alebo iné metódy na udržiavanie teploty;

c) testovacie komory, napr. štandardné 24-jamkové platničky s hĺbkou približne 20 mm (pozri časť „Testovacie komory“, bod 11);

d) napr. samolepiaca fólia na zakrytie 24-jamkových platničiek;

e) inkubátor alebo klimatizovaná miestnosť s regulovanou teplotou umožňujúce udržiavať teplotu 26 ± 1 °C v jamkách (alebo testovacích komorách);

f) pH-meter;

g) oximeter;

h) zariadenie na stanovenie tvrdosti vody a vodivosti;

i) zachytávač vajíčok: podložka na nástroje zo skla, z nehrdzavejúcej ocele alebo iných inertných materiálov, drôtené sito (veľkosť mriežky 2 ± 0,5 mm) z nehrdzavejúcej ocele alebo iného inertného materiálu na ochranu nakladených vajíčok, trecí substrát (napr. imitácie rastlín z inertného materiálu) [TM C.48, dodatok 4a (23)];

j) pipety s rozšírenými otvormi na zber vajíčok;

▼M7

k) sklenené nádoby na prípravu rôznych testovaných koncentrácií a vody na riedenie (kadičky, kalibrované odmerné banky, odmerné valce a odmerné pipety) alebo na zber vajíčok dania pruhovaného (napr. kadičky, kryštalizačné misky);

l) ak sa na vykonanie testu používajú alternatívne expozičné systémy, napríklad prietokové (24) alebo s pasívnym dávkovaním (25), sú potrebné vhodné priestory a vybavenie.

Testovacie komory

11. Mali by sa použiť sklenené alebo polystyrénové testovacie komory (napr. 24-jamkové platničky s objemom plnenia 2,5 – 5 ml na jednu jamku). V prípade podozrenia na adsorpciu na polystyrén (napr. pri nepolárnych, planárnych látkach s vysokou hodnotou Kow) by sa na zníženie eliminácií v dôsledku adsorpcie mali použiť inertné materiály (sklo) (26). Testovacie komory by sa mali v inkubátore umiestniť náhodne

Vlastnosti vody a podmienky testu

12. Na dosiahnutie stupňa tvrdosti vody typického pre široké spektrum povrchových vôd sa odporúča chovnú vodu nariediť. Voda na riedenie sa pripravuje z rekonštituovanej vody (27). Výsledný stupeň tvrdosti by mal zodpovedať 100 – 300 mg/l $CaCO_3$, aby sa predišlo nadmernému vyzrážaniu uhličitanu vápenatého. Možno použiť aj inú dobre charakterizovanú povrchovú alebo studňovú vodu. Rekonštituovanú vodu možno upraviť na chovnú vodu s nízkou tvrdosťou riedením deionizovanou vodou až na pomer 1:5 na minimálnu tvrdosť 30 – 35 mg/l $CaCO_3$. Voda sa pred pridaním testovanej chemikálie prevzdušňuje, aby sa dosiahlo nasýtenie kyslíkom. V jamkách by sa počas celého testu mala udržiavať teplota 26 ± 1 °C. Hodnota pH by mala byť v rozsahu od 6,5 do 8,5 a v rámci tohto rozpätia by sa nemala odchyľovať o viac ako 1,5 jednotky počas celého testu. Ak sa očakáva, že hodnota pH nezostane v tomto rozsahu, pred začatím testu by sa malo upraviť pH. Úprava pH by sa mala vykonať tak, aby sa významne nezmenila koncentrácia zásobného roztoku a aby nedošlo k chemickej reakcii alebo zrážaniu testovanej chemikálie. Na korekciu pH v roztokoch obsahujúcich testovanú chemikáliu sa odporúča použiť chlorovodík (HCl) a hydroxid sodný (NaOH).

Testovacie roztoky

13. Testovacie roztoky vybraných koncentrácií možno pripraviť napríklad zriedením zásobného roztoku. Zásobné roztoky by sa podľa možnosti mali pripraviť jednoduchým zmiešaním alebo pretrepaním testovanej chemikálie vo vode na riedenie mechanickým spôsobom (napr. premiešavaním a/alebo ultrazvukom). Ak sa testovaná chemikália ťažko rozpúšťa vo vode, mali by sa použiť postupy uvedené v usmerňovacom dokumente OECD č. 23 o manipulácii s náročnými látkami a zmesami (28). Používaniu rozpúšťadiel sa treba vyhnúť, ale v niektorých prípadoch môže byť potrebné na vytvorenie vhodne koncentrovaného zásobného roztoku. Ak sa pri príprave zásobného roztoku použije rozpúšťadlo, jeho konečná koncentrácia by nemala byť vyššia ako 100 µl/l a mala by byť rovnaká vo všetkých testovacích nádobách. Ak sa použije rozpúšťadlo, je potrebná dodatočná kontrola s aplikáciou rozpúšťadla.

Chov generačných rýb

14. Na produkciu vajíčok sa použije neresiaca sa populácia neexponovaných danií pruhovaných divokého typu s dobre zdokumentovanou mierou oplodnenia vajíčok. Ryby by nemali mať žiadne makroskopicky zjavné príznaky infekcií a chorôb a počas 2 mesiacov pred trením by nemali absolvovať žiadne (akútne ani profylaktické) ošetrenie farmaceutikami. Neresiace sa

▼M7

ryby sa udržiavajú v akváriách s odporučenou kapacitou násady 1 l vody na rybu a pevnou fotoperiódou trvajúcou 12 – 16 hodín (29)(30)(31)(32)(33). Potrebné je nastaviť optimálnu rýchlosť filtrácie. Nadmerná rýchlosť filtrácie môže vodu výrazne znehodnotiť, takže sa jej treba vyhnúť. Podmienky kŕmenia sú uvedené v dodatku 2. Treba sa vyhnúť nadmernému kŕmeniu, pravidelne by sa mala monitorovať kvalita vody a čistota akvárií a v prípade potreby je potrebné obnoviť pôvodný stav.

Preukázanie odbornosti

15. Referenčná chemikália 3,4-dichlóranilín [použitá vo validačných štúdiách (1)(2)] by sa mala podľa možnosti dvakrát ročne otestovať v celom rozsahu reakcie na koncentráciu s cieľom overiť citlivosť použitého kmeňa rýb. V každom laboratóriu, ktoré prvýkrát zavádza túto skúšku, by sa mala použiť referenčná chemikália. Predtým, ako laboratórium predloží údaje na regulačné účely, môže použiť túto chemikáliu na preukázanie svojej technickej spôsobilosti na vykonávanie tejto skúšky.

Produkcia vajíčok

16. Vajíčka dania pruhovaného možno produkovať metódou trenia v jednotlivých skupinách (v individuálnych trecích nádržiach) alebo masového trenia (v chovných nádržiach). V prípade trenia v skupinách sa samce a samice (napr. v pomere 2:1) v neresiacej sa skupine umiestnia v deň pred testom (pred začiatkom súmraku) na niekoľko hodín do trecích nádrží. Keďže v skupinách dania pruhovaného určených na trenie občas nemusí dôjsť k treniu, odporúča sa súbežne použiť aspoň tri trecie nádrže. S cieľom zabrániť genetickému skresleniu sa odoberú vajíčka od najmenej troch neresiacich sa skupín, následne sa zmiešajú a náhodne vyberú na test.

17. Na účely zberu vajíčok sa do trecích nádrží alebo chovných nádrží umiestnia zachytávače vajíčok, a to v deň pred testom (pred začiatkom súmraku) alebo v deň testu (pred svitaním) Na zabránenie predácii vajíčok dospelými daniami pruhovanými sa zachytávače vajíčok zakryjú inertným drôteným sitom s vhodnou veľkosťou mriežky (približne 2 ± 0,5 mm). Ak sa to bude považovať za potrebné, k situ sa ako podnet k treniu môžu pripevniť umelé rastliny vyrobené z inertného materiálu (napr. z plastu alebo zo skla) (3)(4)(5)(23)(35). Mali by sa použiť vhodne upravené plastové materiály, ktoré sa nevylúhujú (napr. ftaláty). K páreniu, treniu a oplodneniu dochádza do 30 minút od začiatku svitania, potom možno zachytávače vajíčok so zachytenými vajíčkami opatrne odobrať. Odporúča sa vajíčka po odbere zo zachytávačov vajíčok prepláchnuť rekonštituovanou vodou.

Diferenciácia vajíčok

18. Pri teplote 26 °C prejdú oplodnené vajíčka prvým ryhovaním po približne 15 minútach, pričom následnými synchrónnymi ryhovaniami sa vytvoria blastoméry so 4, 8, 16 a 32 bunkami (pozri dodatok 3) (35). V týchto fázach možno oplodnené vajíčka jasne identifikovať podľa vývinu blastuly

POSTUP

Podmienky expozície

19. Dvadsať embryí na koncentráciu (jedno embryo na jamku) sa vystaví pôsobeniu testovanej chemikálie. Expozícia by mala byť taká, že sa počas celého testu udrží ± 20 % nominálnej koncentrácie chemikálie. Ak to nie je možné dosiahnuť v statickom systéme, treba použiť polostatické obnovovanie so zvládnuteľným intervalom (napr. obnovenie každých 24 hodín). V týchto prípadoch sa expozičné koncentrácie musia overiť minimálne pri najvyššej a najnižšej testovanej koncentrácii na začiatku a konci každého intervalu expozície (pozri bod 36). Ak nie je možné udržať expozičnú koncentráciu

▼M7

± 20 % nominálnej koncentrácie, na začiatku a konci každého intervalu expozície sa musia merať všetky koncentrácie (pozri bod 36). Pri obnovovaní treba dbať na to, aby embryá zostali zakryté malým množstvom starého testovacieho roztoku s cieľom zabrániť ich vyschnutiu. Koncepciu testu možno prispôsobiť tak, aby spĺňala požiadavky na testovanie konkrétnych látok [napr. prietokové systémy (24) alebo systémy s pasívnym dávkovaním (25) v prípade ľahko degradovateľných alebo vysokoadsorpčných látok (29), alebo iné systémy v prípade prchavých látok (36)(37)]. V každom prípade treba dbať na minimalizovanie akéhokoľvek stresu embryí. Testovacie komory by sa aspoň počas 24 hodín pred začatím testu mali ošetriť testovacími roztokmi. Podmienky testu sú zhrnuté v dodatku 2.

Testované koncentrácie

20. Na splnenie štatistických požiadaviek je zvyčajne potrebných päť koncentrácií testovanej chemikálie s odstupom s konštantným faktorom nepresahujúcim 2,2. Ak sa použije menej ako päť koncentrácií, je potrebné uviesť zdôvodnenie. Najvyššia testovaná koncentrácia by ideálne mala vyvolať 100 % letalitu a najnižšia testovaná koncentrácia by ideálne nemala mať žiadne pozorovateľné účinky, ako je uvedené v bode 28. Test na vyhľadávanie rozsahu vykonaný pred konečným testom umožní vybrať vhodný rozsah koncentrácie. Vyhľadávanie rozsahu sa zvyčajne vykonáva s použitím desiatich embryí na koncentráciu. Nasledujúce pokyny sa vzťahujú na vykonanie testu na 24-jamkových platničkách. Ak sa použijú odlišné testovacie komory (napr. malé Petriho misky) alebo ak sa testuje viac koncentrácií, pokyny sa musia príslušne upraviť.

21. Podrobnosti a obrazové pokyny na rozmiestnenie koncentrácií na 24-jamkových platničkách sú uvedené v bode 27 a v dodatku 4, obrázok 1.

Kontroly

22. Kontrolné skupiny udržiavané vo vode na riedenie sú potrebné ako negatívne kontroly, ako aj vnútorné kontroly platničiek. Ak sa v rámci vnútornej kontroly platničky pozoruje viac ako 1 mŕtve embryo, platnička sa vylúči, čím sa zníži počet koncentrácií použitých na určenie hodnoty LC_{50}. Ak sa vylúči celá platnička, môže sa znížiť schopnosť vyhodnotiť a rozpoznať pozorované účinky, najmä ak sa vylúči tá platnička, ktorá slúži na kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla, alebo platnička, na ktorej sú zároveň postihnuté embryá ovplyvnené chemikáliou. V prvom prípade je nutné test zopakovať. V druhom prípade môže strata celej ovplyvňovanej skupiny (skupín) v dôsledku úmrtnosti vo vnútornej kontrole obmedziť schopnosť vyhodnotiť účinky a stanoviť hodnoty LC_{50}.

23. Vykoná sa pozitívna kontrola pri pevnej koncentrácii 4 mg/l 3,4-dichlóranilínu s každou vzorkou vajíčok použitou na testovanie.

24. Ak sa používa rozpúšťadlo, na samostatnej 24-jamkovej platničke sa rozpúšťadlu vystaví doplnková skupina 20 embryí, ktorá predstavuje kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla. Na to, aby sa test mohol považovať za prijateľný, by sa malo sa preukázať, že rozpúšťadlo nemá žiadny významný vplyv na čas liahnutia ani prežitie, a nespôsobuje ani iné nepriaznivé účinky na embryá (pozri bod 8c).

Začiatok expozície a trvanie testu

25. Test sa začne čo najskôr po oplodnení vajíčok a skončí sa po 96 hodinách expozície. Embryá sa ponoria do testovacích roztokov pred začatím ryhovania blastodisku alebo najneskôr do dosiahnutia 16-bunkového štádia. Na to, aby bolo možné začať expozíciu s minimálnym oneskorením, náhodne sa vyberie aspoň dvojnásobný počet vajíčok potrebných na každú ovplyvňovanú skupinu a prenesie sa do príslušných koncentrácií a kontrol (napr. do 100 ml kryštalizačných misiek; vajíčka by mali byť úplne zakryté), a to najneskôr 90 minút po oplodnení

26. Životaschopné oplodnené vajíčka by sa mali oddeliť od neoplodnených vajíčok a preniesť na 24-jamkové platničky, ktoré sa predtým 24 hodín pripravovali v podmienkach testu. Následne by sa do 180 minút od oplodnenia mali doplniť 2 ml čerstvo pripraveného testovacieho roztoku na jamku.

▼M7

Prostredníctvom stereomikroskopie (podľa možnosti ≥ 30-násobné zväčšenie) sa vyberú oplodnené vajíčka, v ktorých prebieha ryhovanie a ktoré počas ryhovania nevykazujú žiadne zjavné nepravidelnosti (napr. asymetriu, tvorbu vačkov) ani poškodenia choriónu. Informácie o zbere a oddeľovaní vajíčok nájdete v dodatku 3, obr. 1 a 3 a v dodatku 4, obr. 2.

Rozloženie vajíčok na 24-jamkových platničkách

27. Vajíčka sa rozložia na jamkové platničky v týchto počtoch (pozri aj dodatok 4, obr. 1):

— 20 vajíčok na jednu platničku pre každú testovanú koncentráciu,

— 20 vajíčok na jednu platničku ako kontrola s aplikáciou rozpúšťadla (ak to je potrebné),

— 20 vajíčok na jednu platničku ako pozitívna kontrola,

— 4 vajíčka vo vode na riedenie ako vnútorná kontrola platničky na každú z uvedených platničiek,

— 24 vajíčok vo vode na riedenie na jednu platničku ako negatívna kontrola.

Pozorovania

28. Koncové pozorovania každého testovaného embrya zahŕňajú koaguláciu embryí, nevytvorenie somitov, neoddelenie chvosta a neprítomnosť srdcového tepu (tabuľka 1). Tieto pozorovania slúžia na stanovenie letality: každý kladný výsledok jedného z týchto pozorovaní znamená, že embryo dania pruhovaného je mŕtve. Okrem toho sa každý deň od 48. hodiny zaznamenáva liahnutie v ovplyvňovaných i kontrolných skupinách. Pozorovania sa zaznamenávajú každých 24 hodín až do konca testu.

Tabuľka 1

Koncové pozorovania akútnej toxicity u embryí dania pruhovaného 24 – 96 hodín po oplodnení

	Časy expozície			
	24 hod.	48 hod.	72 hod.	96 hod.
Koagulované embryá	+	+	+	+
Nevytvorenie somitov	+	+	+	+
Neoddelenie chvosta	+	+	+	+
Neprítomnosť srdcového tepu		+	+	+

29. *Koagulácia embrya:* Koagulované embryá sú mliečnobiele a pod mikroskopom vyzerajú tmavé (pozri dodatok 5, obr. 1). Počet koagulovaných embryí sa stanovuje po 24, 48, 72 a 96 hodinách.

30. *Nevytvorenie somitov:* Pri teplote 26 ± 1 °C sa u normálne sa vyvíjajúceho embrya dania pruhovaného vytvorí po 24 hodinách približne 20 somitov (pozri dodatok 5, obrázok 2). Normálne vyvinuté embryo vykazuje spontánne pohyby (kontrakcie zo strany na stranu). Spontánne pohyby nasvedčujú vytvoreniu somitov. Neprítomnosť somitov sa zaznamenáva po 24, 48, 72 a 96 hodinách. Nevytvorenie somitov po 24 hodinách môže byť dôsledkom celkového oneskorenia vývinu. Somity by mali byť vyvinuté najneskôr po 48 hodinách. Ak nie, embryá sa považujú za mŕtve.

31. *Neoddelenie chvosta:* U normálne sa vyvíjajúceho embrya dania pruhovaného sa oddelenie chvosta (pozri dodatok 5, obrázok 3) od žĺtka pozoruje po

▼M7

posteriórnom predĺžení tela embrya. Neprítomnosť oddelenia chvosta sa zaznamenáva po 24, 48, 72 a 96 hodinách.

32. *Neprítomnosť srdcového tepu:* U normálne sa vyvíjajúceho embrya dania pruhovaného je pri teplote 26 ± 1 °C srdcový tep viditeľný po 48 hodinách (pozri dodatok 5, obrázok 4). Pri zaznamenávaní tohto sledovaného parametra je potrebná mimoriadna obozretnosť, lebo nepravidelný (eratický) srdcový tep by sa *nemal* zaznamenať ako letálny. Okrem toho sa za letálny nepovažuje viditeľný srdcový tep bez obehu v brušnej aorte. Na zaznamenanie tohto sledovaného parametra by sa embryá bez srdcového tepu mali pozorovať pri aspoň 80-násobnom zväčšení aspoň jednu minútu. Neprítomnosť srdcového tepu sa zaznamenáva po 48, 72 a 96 hodinách.

33. Vo všetkých ovplyvňovaných a kontrolných skupinách by sa mala od 48. hodiny zaznamenávať a uvádzať miera liahnutia. Hoci liahnutie nie je finálnym parametrom použitým na výpočet hodnoty LC_{50}, vyliahnutím sa zabezpečí expozícia embrya bez potenciálnej bariérovej funkcie choriónu, čo môže pomôcť pri výklade údajov.

34. Podrobný opis normálneho vývinu (35) a príklady abnormálneho vývinu embryí dania pruhovaného sú znázornené v dodatkoch 3 a 5.

Analytické merania

35. Na začiatku a na konci testu sa odmeria pH, celková tvrdosť a vodivosť v kontrole (kontrolách) a pri najvyššej koncentrácii testovanej chemikálie. V polostatických obnovovacích systémoch by sa hodnota pH mala odmerať pred obnovením vody a po ňom. Koncentrácia rozpusteného kyslíka sa meria na konci testu v negatívnych kontrolách a v skupine s najvyššou testovanou koncentráciou so životaschopnými embryami, kde by mala byť v súlade s validačnými kritériami testu (pozri bod 8f). Ak existuje obava, že medzi rôznymi 24-jamkovými platničkami sa líši teplota, odmeria sa v troch náhodne vybraných nádobách. Teplota sa má ideálne zaznamenávať nepretržite počas testu alebo aspoň raz denne.

36. V statickom systéme by sa koncentrácia testovanej chemikálie mala merať aspoň v skupine s najvyššou a najnižšou testovanou koncentráciou, ale ideálne vo všetkých ovplyvňovaných skupinách, a to na začiatku a konci testu. V polostatických (obnovovacích) testoch, kde sa očakáva, že koncentrácia testovanej chemikálie zostane v rozmedzí ± 20 % nominálnych hodnôt, sa odporúča analyzovať aspoň skupinu s najvyššou a najnižšou testovanou koncentráciou, a to bezprostredne po príprave a bezprostredne pred obnovením. V testoch, kde sa očakáva, že koncentrácia testovanej chemikálie nezostane v rozmedzí ± 20 % nominálnej hodnoty, sa musia analyzovať všetky testované koncentrácie, a to bezprostredne po príprave a bezprostredne pred obnovením. V prípade nedostatočného objemu na analýzu môže byť užitočné spojiť testovacie roztoky alebo použiť náhradné komory z toho istého materiálu a s tým istým pomerom objemu k ploche povrchu ako 24-jamkové platničky. Dôrazne sa odporúča, aby výsledky vychádzali z nameraných koncentrácií. Ak koncentrácie nezostanú v rozmedzí 80 – 120 % nominálnej koncentrácie, účinné koncentrácie sa majú vyjadriť v pomere ku geometrickému priemeru nameraných koncentrácií. Ďalšie podrobnosti nájdete v kapitole 5 usmerňovacieho dokumentu OECD o testovaní vodnej toxicity náročných látok a zmesí (28).

LIMITNÝ TEST

37. Pomocou postupov opísaných v tejto testovacej metóde možno vykonať limitný test so 100 mg/l testovanej chemikálie alebo pri limite jej rozpustnosti v testovacom médiu (podľa toho, ktorá hodnota je nižšia) s cieľom preukázať, že hodnota LC_{50} je vyššia ako táto koncentrácia. Limitný test by sa mal vykonať s použitím 20 embryí v ovplyvňovanej skupine, pozitívnej

▼M7

kontrole a – podľa potreby – v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla a s použitím 24 embryí v negatívnej kontrole. Ak percento letality pri testovanej koncentrácii prekročí úmrtnosť v negatívnej kontrole (alebo v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla) o 10 %, mala by sa vykonať úplná štúdia. Všetky pozorované účinky by sa mali zaznamenať. Ak úmrtnosť v negatívnej kontrole (alebo v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla) prekročí 10 %, test je neplatný a mal by sa zopakovať.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Spracovanie výsledkov

38. V tomto teste sa na účely štatistickej analýzy jednotlivé jamky považujú za nezávislé replikáty. Percentá embryí, u ktorých je aspoň jedno z koncových pozorovaní pozitívne v čase 48 a/alebo 96 hodín, sa zakreslia do grafu proti testovaným koncentráciám. Na výpočet sklonu krivky, hodnôt LC_{50} a hraníc spoľahlivosti (95 %) by sa mali použiť vhodné štatistické metódy (38) s prihliadnutím na usmerňovací dokument OECD o súčasných prístupoch k štatistickej analýze údajov o ekotoxicite (39).

Správa o teste

39. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

Jednozložkové látky

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď. (vrátane obsahu organicky viazaného uhlíka, ak to je vhodné).

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Testovacie organizmy:

— vedecký názov, kmeň, zdroj a metóda zberu oplodnených vajíčok a následnej manipulácie.

Podmienky testu:

— použitý testovací postup (napr. polostatický obnovovací),

— fotoperióda,

— koncepcia testu (napr. počet testovacích komôr, druhy kontrol),

— charakteristiky kvality vody na chov rýb (napr. pH, tvrdosť, teplota, vodivosť, rozpustený kyslík),

— koncentrácia rozpusteného kyslíka, pH, celková tvrdosť, teplota a vodivosť testovacích roztokov na začiatku a po 96 hodinách,

— metóda prípravy zásobných roztokov a testovacích roztokov a frekvencia obnovovania,

▼M7

— odôvodnenie použitia a výberu rozpúšťadla, ak je iné ako voda,

— nominálne testované koncentrácie a výsledky všetkých analýz na stanovenie koncentrácie testovanej chemikálie v testovacích nádobách, mala by sa oznámiť aj účinnosť obnovy a kvantifikačný limit (LoQ),

— dôkaz, že kontroly splnili všeobecné validačné kritériá platnosti pre prežitie,

— miera oplodnenia vajíčok,

— miera liahnutia v ovplyvňovaných a kontrolných skupinách.

Výsledky:

— maximálna koncentrácia nespôsobujúca úmrtnosť počas trvania testu,

— minimálna koncentrácia spôsobujúca 100 % úmrtnosť počas trvania testu,

— kumulatívna úmrtnosť pri každej koncentrácii v odporučených časoch pozorovania,

— hodnoty LC_{50} v čase 96 hodín (a prípadne v čase 48 hodín) pre úmrtnosť s 95 % hranicami spoľahlivosti, ak je to možné,

— graf krivky závislosti úmrtnosti od koncentrácie na konci testu,

— úmrtnosť v kontrolách (negatívne kontroly, vnútorné kontroly platničiek, ako aj pozitívna kontrola a prípadná použitá kontrola s aplikáciou rozpúšťadla),

— údaje o výsledku každého zo štyroch koncových pozorovaní,

— výskyt a opis morfologických a fyziologických abnormalít, ak sú prítomné (pozri príklady uvedené v dodatku 5, obrázok 2),

— udalosti v priebehu testu, ktoré mohli ovplyvniť výsledky,

— štatistická analýza a spracovanie údajov (probitová analýza, model logistickej regresie a geometrický priemer hodnoty LC_{50}),

— sklon a hranice spoľahlivosti regresie (transformovanej) krivky závislosti veličiny od koncentrácie.

Všetky odchýlky od testovacej metódy a príslušné vysvetlenia.

Rozbor a interpretácia výsledkov.

LITERATÚRA

1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: 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 acute

▼M7

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. (2013). Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 32: 1768-1783.

(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. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), 196-209

(17) Kapitola C.4 tejto prílohy: Ľahká biodegradovateľnosť.

(18) Kapitola C.29 tejto prílohy: Ľahká biodegradovateľnosť, CO_2 vo vzduchotesne uzatvorených nádobách.

(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) Kapitola C.48 tejto prílohy: Skúška krátkodobého rozmnožovania rýb. Pozri dodatok 4a.

(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. k dispozícii na stránke: [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) Európska komisia (2007) Odporúčanie Komisie 2007/526/EC z 18. júna 2007 o usmerneniach týkajúcich sa umiestnenia zvierat používaných na pokusné a iné vedecké účely a starostlivosti o ne [oznámené pod číslom dokumentu K(2007) 2525] (http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:SK:PDF).

(33) Európska únia (2010) Smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2010 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely (Ú. v. EÚ L 276, 20.10.2010, s. 33).

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:SK: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) Kapitola C.4 tejto prílohy: Test akútnej imobilizácie dafnií (Daphnia sp.).

(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. k dispozícii na stránke: [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

Dodatok 1

DEFINÍCIE

Koncový sledovaný parameter: účinok pôsobiaci na úrovni populácie.

Blastula: zhluk buniek okolo animálneho pólu, ktorý pokrýva určitú časť žĺtka.

Chemikália: látka alebo zmes.

Epibólia: rozsiahle šírenie prevažne epidermálnych buniek vo fáze gastrulácie embrya a ich presun z dorzálnej na ventrálnu stranu, v dôsledku čoho sa vrstvy endodermálnych buniek internalizujú procesom podobným invaginácii a žĺtok sa začlení do embrya.

Prietokový test: test s neustálym prietokom testovacích roztokov cez testovací systém počas trvania expozície.

Vnútorná kontrola platničky: vnútorná kontrola skladajúca sa zo 4 jamiek naplnených vodou na riedenie na každej 24-jamkovej platničke, ktorá slúži na identifikáciu možnej kontaminácie platničiek výrobcom alebo výskumným pracovníkom v priebehu postupu, ako aj všetkých vplyvov platničky, ktoré by potenciálne mohli ovplyvniť výsledok testu (napr. teplotný gradient).

IUPAC: Medzinárodná únia pre čistú a aplikovanú chémiu (International Union of Pure and Applied Chemistry)

Chovná voda: voda, v ktorej sa chovajú dospelé ryby.

Priemerná letálna koncentrácia (LC_{50}): koncentrácia testovanej chemikálie, ktorá sa odhadne ako letálna pre 50 % testovacích organizmov počas trvania testu.

Polostatický obnovovací test: test s pravidelným obnovovaním testovacích roztokov po stanovenom období (napr. každých 24 hodín).

SMILES: zjednodušený systém zadávania molekulárnych štruktúr (Simplified Molecular Input Line Entry Specification).

Somit: vo vyvíjajúcom sa embryu stavovcov sú somity zhluky mezodermy uložené laterálne od neurálnej trubice, z ktorých sa časom vyvinie koža (dermatóm), kostrové svalstvo (myotóm) a stavce (sklerotóm).

Statický test: test, pri ktorom testovacie roztoky zostávajú nezmenené počas celého trvania testu.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

▼M7

Dodatok 2

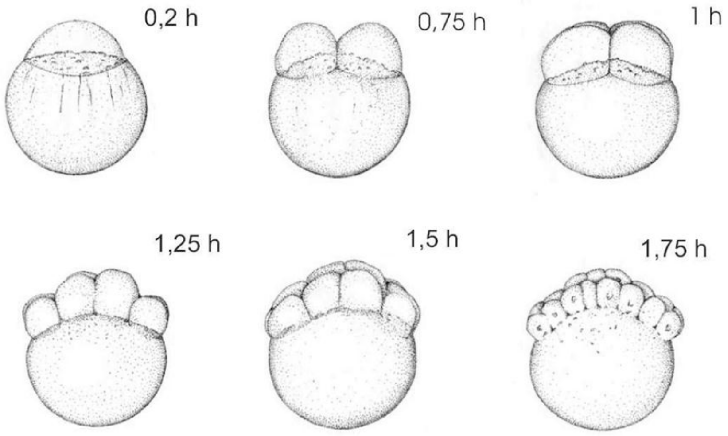
CHOV, NERESENIE A TYPICKÉ PODMIENKY PRE TESTY AKÚTNEJ TOXICITY NA EMBRYÁCH DANIA PRUHOVANÉHO

Danio pruhované (*Danio rerio*)		
Pôvod druhu		India, Barma, Malakka, Sumatra
Pohlavný dimorfizmus		Samice: vyčnievajúce brucho pri nosení vajíčok Samce: tenšie, oranžové sfarbenie medzi modrými pozdĺžnymi pruhmi (zreteľné najmä na análnej plutve)
Kŕmny režim		Suché vločky (max. 3 % hmotnosti ryby na deň) 3 až 5-krát denne, okrem toho naupliá žiabronôžky (rod *Artemia*) a/alebo malé dafnie primeranej veľkosti získané z nekontaminovaného zdroja. Kŕmenie živou potravou je zdrojom obohatenia prostredia, preto sa živá potrava má dávať vždy, keď je to možné. Na zaistenie optimálnej kvality vody sa má zvyšná potrava a výkaly odstrániť približne jednu hodinu po kŕmení.
Približná hmotnosť dospelých rýb		Samice: 0,65 ± 0,13 g Samce: 0,5 ± 0,1 g
Chov rodičovských rýb	Osvetlenie	Žiarivky (široké spektrum), 10 – 20 µE/m^2/s, 540 – 1 080 luxov alebo 50 – 100 ft-c (úrovne v laboratórnom prostredí), fotoperióda 12 – 16 hod.
	Teplota vody	26 ± 1 °C
	Kvalita vody	Nasýtenie O2 ≥ 80 %, tvrdosť: napr. ~ 30 – 300 mg/l $CaCO_3$, NO_3^-: ≤ 48 mg/l, NH_4^+ a NO_2^-: < 0,001 mg/l, zvyškový chlór < 10 µg/l, celkový obsah organického chlóru < 25 ng/l, pH = 6,5 – 8,5
	Ďalšie kritériá kvality vody	Tuhé častice < 20 mg/l, celkový obsah organického uhlíka < 2 mg/l, celkový obsah organofosforových pesticídov < 50 ng/l, celkový obsah organochlórových pesticídov a polychlórovaných bifenylov < 50 ng/l
	Veľkosť nádrže na chov	napr. 180 l, 1 ryba/liter
	Čistenie vody	Nepretržité (filtrácia pomocou aktívneho uhlia), iné možnosti zahŕňajú kombinácie so polostatickým obnovovacím chovom alebo s prietokovým systémom s priebežným obnovovaním vody
	Odporúčaný pomer samcov a samíc na neresenie	2:1 (alebo masové trenie)
Trecie nádrže		napr. 4 l nádrže vybavené dnom s oceľovou mriežkou a umelými rastlinami na stimuláciu trenia, vonkajšie vyhrievané podložky alebo masové trenie v chovných nádržiach
Štruktúra a vzhľad vajíčok		Stabilný chorión (t. j. mimoriadne priehľadné, nelepivé, priemer ~ 0,8 – 1,5 mm)
Miera trenia		Jedna dospelá samica nakladie aspoň 50 – 80 vajíčok za deň. V závislosti od kmeňa môže byť miera trenia podstatne vyššia. Miera oplodnenia by mala byť ≥ 70 %. V prípade ryby, ktorá sa trie prvýkrát, môže byť miera oplodnenia vajíčok v prvých niekoľkých znáškach nižšia.
Typ testu		Statický, polostatický obnovovací, prietokový, teplota 26 ± 1 °C, testovacie komory, ktoré sa 24 hodín prispôsobovali podmienkam testu (napr. 24-jamkové platničky, 2,5 – 5 ml na jednu jamku)

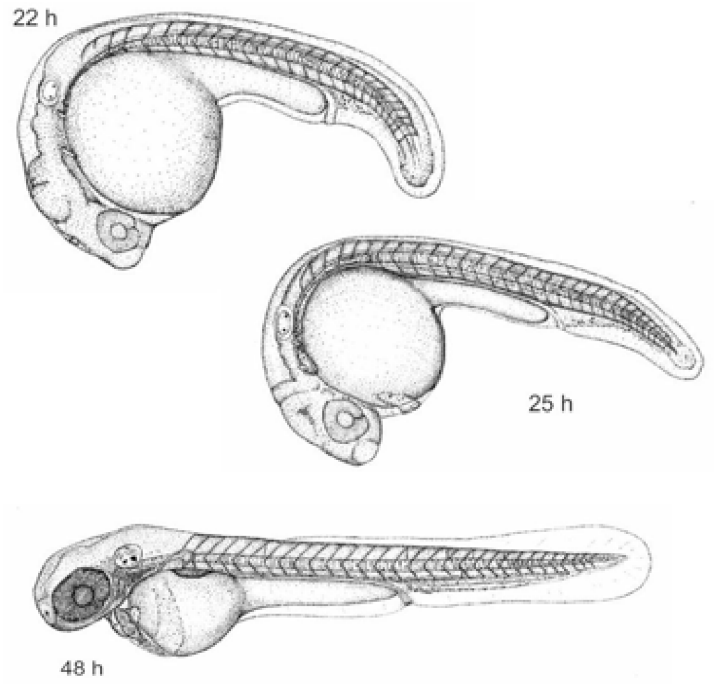
▼M7

Dodatok 3

NORMÁLNY VÝVIN DANIA PRUHOVANÉHO PRI TEPLOTE 26 °C

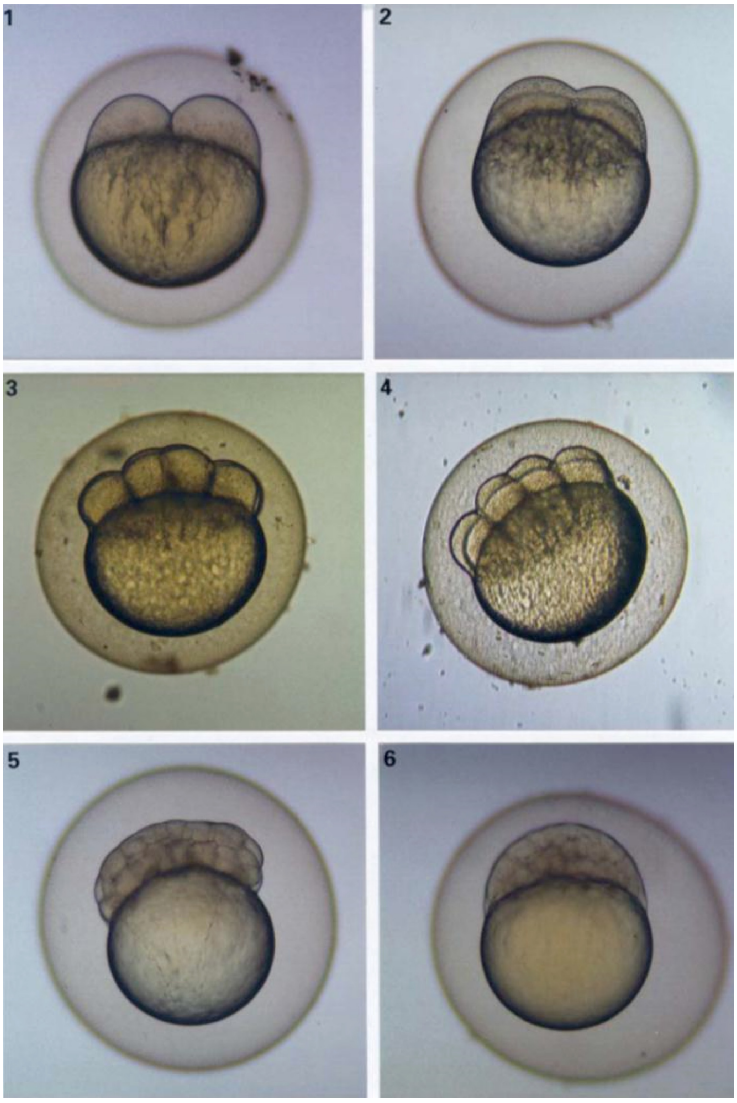


Obr. 1: Vybrané štádiá raného vývinu dania pruhovaného (*Danio rerio*): 0,2 – 1,75 hod. po oplodnení [z Kimmel *et al*., 1995 (35)]. Časovú postupnosť normálneho vývinu možno použiť na stanovenie oplodnenia i životaschopnosti vajíčok (pozri bod 26: Výber oplodnených vajíčok).



Obr. 2: Vybrané štádiá neskoršieho vývinu dania pruhovaného (*Danio rerio*) (embryo bez choriónu na zlepšenie viditeľnosti): 22 – 48 hod. po oplodnení [z Kimmel *et al*., 1995 (35)].

▼M7



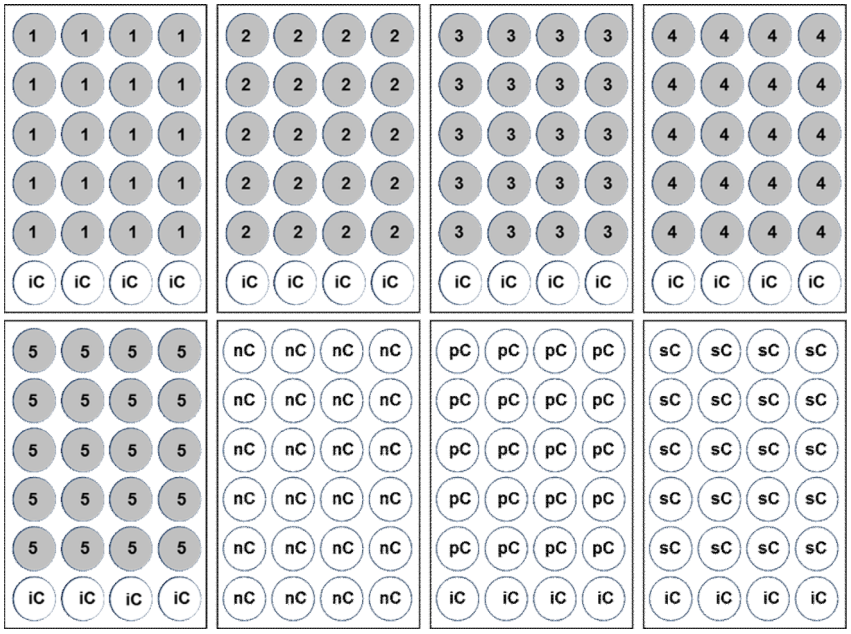
Obr. 3: Normálny vývin embryí dania pruhovaného (*Danio rerio*): 1. 0,75 hod., 2-bunkové štádium; 2. 1 hod., 4-bunkové štádium; 3. 1,2 hod., 8-bunkové štádium; 4. 1,5 hod., 16-bunkové štádium; 5. 4,7 hod., začiatok epibólie; 6. 5,3 hod., pribl. 50 % epibólia [z Braunbeck & Lammer 2006 (40)].

▼M7

Dodatok 4

Obr. 1

Usporiadanie 24-jamkových platničiek



1 – 5: päť testovaných koncentrácií/chemikálií;

nC: negatívna kontrola (voda na riedenie);

iC: vnútorná kontrola platničky (voda na riedenie);

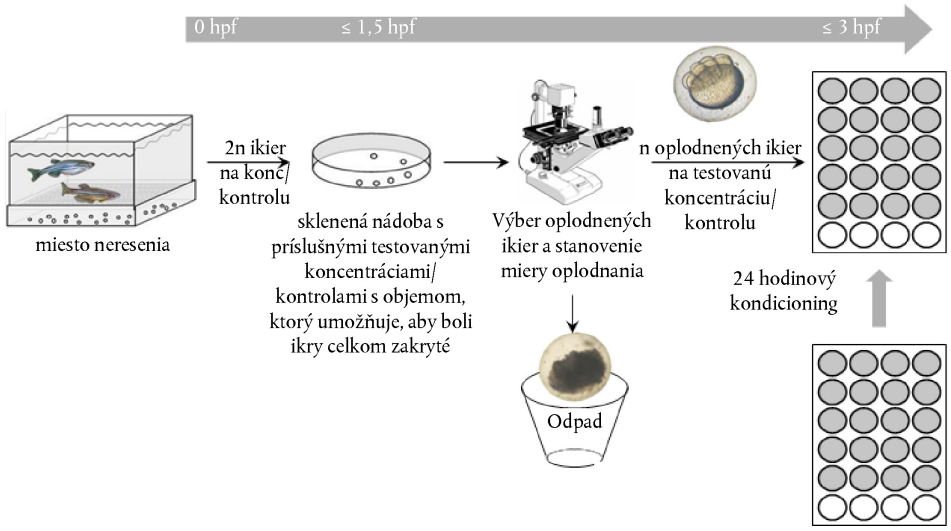
pC: pozitívna kontrola (3,4-DCA 4 mg/l);

sC: kontrola s aplikáciou rozpúšťadla

▼M7

Obr. 2

Diagram testovacieho postupu akútnej toxicity na embryách dania pruhovaného (zľava doprava): produkcia vajíčok, zber vajíčok, predbežná expozícia ihneď po oplodnení v sklenených nádobách, výber oplodnených vajíčok pomocou invertovaného mikroskopu alebo binokulárneho mikroskopu a umiestnenie oplodnených vajíčok do 24-jamkových platničiek pripravených s príslušnými testovanými koncentráciami/kontrolami, n = počet vajíčok potrebných pre každú testovanú koncentráciu/kontrolu (tu 20), hpf = hodiny po oplodnení.



▼M7

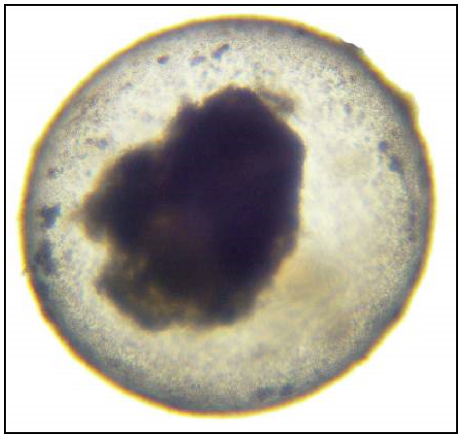
Dodatok 5

ATLAS SLEDOVANÝCH LETÁLNYCH PARAMETROV PRE TEST AKÚTNEJ TOXICITY NA EMBRYÁCH DANIA PRUHOVANÉHO

Tieto koncové sledované parametre poukazujú na akútnu toxicitu a následne na smrť embrya: *koagulácia embrya, neoddelenie chvosta, nevytvorenie somitov a neprítomnosť srdcového tepu*. Nasledujúce vybrané mikrografy ilustrujú tieto sledované parametre.

Obr. 1

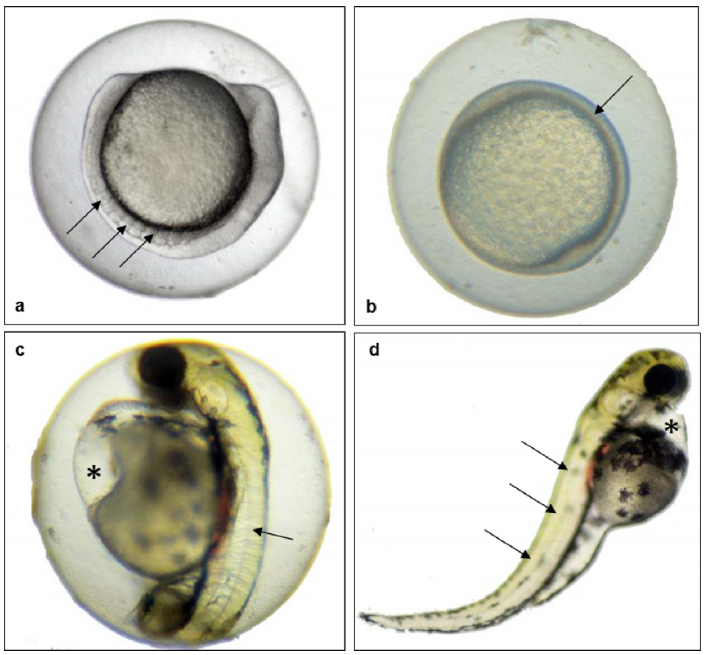
Koagulácia embrya:



pri jasnom osvetlení poľa vidieť na koagulovaných embryách dania pruhovaného rôzne nepriehľadné štruktúry.

Obr. 2

Nevytvorenie somitov:

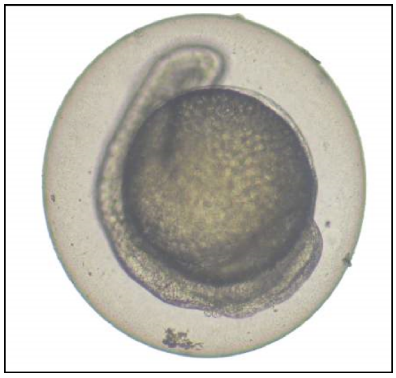


▼M7

hoci vývin 24-hodinového embrya dania pruhovaného na obr. a) je spomalený o pribl. 10 hod, vidieť na ňom dobre vyvinuté somity (→), kým na embryu na obr. b) nevidieť žiadne známky tvorby somitov (→). Hoci 48-hodinové embryo dania pruhovaného na obr. c) má výrazný edém žĺtkového vaku (*), vidieť na ňom zreteľne vytvorené somity (→), kým na 96-hodinovom embryu na obr. d) nevidieť žiadne známky tvorby somitov (→). Všimnite si aj zakrivenie chrbtice (skoliózu) a perikardiálny edém (*) na embryu na obr. d).

Obr. 3

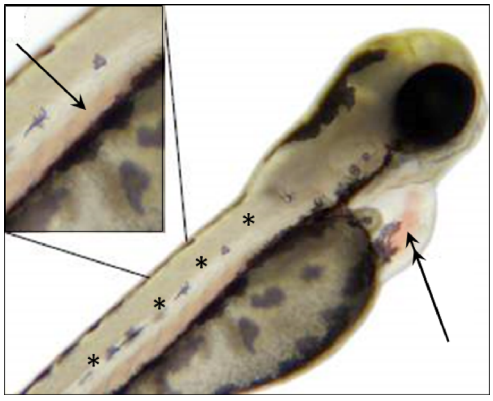
Neoddelenie chvostového pupeňa pri pohľade zboku



(a: →; 96-hodinové embryo dania pruhovaného). Všimnite si aj neprítomnosť očného pupeňa (*).

Obr. 4

Neprítomnosť srdcového tepu



Neprítomnosť srdcového tepu možno z podstaty veci len ťažko ilustrovať na mikrografe. Neprítomnosť srdcového tepu sa prejavuje tým, že srdce sa nesťahuje (dvojitá šípka). Nehybnosť krvných buniek, napr. v brušnej aorte (→ vo vloženom obrázku) nie je ukazovateľom neprítomnosti srdcového tepu. Všimnite si aj nevytvorenie somitov v tomto embryu (*, homogénny, nesegmentovaný vzhľad svalového tkaniva). Dĺžka pozorovania na zaznamenanie neprítomnosti srdcového tepu by mala byť najmenej jedna minúta s minimálne 80-násobným zväčšením.

▼M7

C.50. **TEST TOXICITY PRE STOLÍSTOK KLASNATÝ (*MYRIOPHYLLUM SPICATUM*) V SYSTÉME BEZ SEDIMENTU**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov 238 (2014). Je určená na vyhodnotenie toxicity chemikálií pre ponorenú vodnú dvojklíčnolistovú rastlinu stolístok klasnatý (*Myriophyllum spicatum*) z čeľade zrnulkovité. Vychádza z existujúcej testovacej metódy ASTM (1) upravenej ako testovací systém bez sedimentu (2), ktorý umožňuje odhad vlastnej ekotoxicity testovaných chemikálií (nezávisle od spôsobu distribúcie testovanej chemikálie medzi vodu a sediment). Testovací systém bez sedimentu má nízku analytickú zložitosť (len vodná fáza) a výsledky možno analyzovať spoločne a/alebo porovnaním s výsledkami získanými v teste na Lemna sp. (3). Požadované sterilné podmienky navyše umožňujú udržiavať čo najmenší vplyv mikroorganizmov a rias (príjem/degradácia chemikálie atď.). Týmto testom sa nenahrádzajú iné testy vodnej toxicity, ale mali by sa ním skôr dopĺňať, a tak umožniť úplnejšie posúdenie nebezpečenstva a rizika pre vodné rastliny. Testovacia metóda bola validovaná kruhovým testom (4).

2. Uvádzajú sa informácie o testovaní s obnovou (polostatická metóda) a bez obnovy (statická metóda) testovacieho roztoku. V závislosti od cieľov testu a regulačných požiadaviek sa polostatická metóda odporúča použiť napríklad pre látky, ktoré z roztoku rýchlo unikajú v dôsledku odparovania, adsorpcie, fotodegradácie, hydrolýzy, vyzrážania alebo biodegradácie. Ďalšie informácie sú uvedené v literatúre pod číslom (5). Táto testovacia metóda sa vzťahuje na látky, pre ktoré bola táto testovacia metóda validovaná [pozri podrobnosti v správe o kruhovom teste (4)], alebo na prípravky alebo známe zmesi. Ak sa testuje zmes, jej zložky by sa mali v čo najväčšej miere identifikovať a kvantifikovať. Táto testovacia metóda v systéme bez sedimentu pre *Myriophyllum spicatum* dopĺňa test toxicity pre *Myriophyllum spicatum* v systéme voda – sediment (6). Pred použitím tejto testovacej metódy na testovanie zmesi na regulačné účely by sa malo posúdiť, či môže poskytnúť primerané výsledky na tieto účely, a ak áno, je nutné to zdôvodniť. Tieto úvahy nie sú potrebné, ak existuje regulačná požiadavka na testovanie zmesi.

PRINCÍP TESTU

3. Nepretržite rastúce rastlinné kultúry *Myriophyllum spicatum* (iba v upravenom Andrewsovom médiu, pozri dodatok 2) sa nechajú rásť ako monokultúry v rôznych koncentráciách testovanej chemikálie počas obdobia 14 dní v testovacom systéme bez sedimentu. Cieľom testu je kvantifikovať účinky chemikálie na vegetatívny rast v tomto období na základe hodnotenia zvolených meraných premenných. Merané premenné sú rast dĺžky výhonku, bočných vetiev a koreňov, ako aj vývoj čerstvej a suchej hmotnosti a nárast počtu praslenov. Okrem toho sa zohľadňujú aj zreteľné kvalitatívne zmeny testovacích organizmov, napríklad deformácia alebo chloróza a nekróza, ktoré sa prejavujú zožltnutím alebo bielym a hnedým sfarbením. Na kvantifikovanie účinkov súvisiacich s chemikáliou sa rast v testovacích roztokoch porovnáva s rastom v kontrolách a stanoví sa koncentrácia spôsobujúca špecifickú x % inhibíciu rastu, ktorá sa vyjadrí ako EC_x, pričom „x“ môže mať akúkoľvek hodnotu v závislosti od regulačných požiadaviek, napr. EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Treba poznamenať, že odhady hodnôt EC_{10} a EC_{20} sú spoľahlivé a vhodné len v testoch, v ktorých sú variačné koeficienty pre kontrolné rastliny nižšie ako úroveň účinku, ktorá sa odhaduje, t. j. variačné koeficienty by mali byť < 20 %, aby bolo možné spoľahlivo odhadnúť hodnotu EC_{20}.

4. Stanovuje sa priemerná špecifická rýchlosť rastu (odhadnutá z vyhodnotenia dĺžky hlavného výhonku a ďalších troch meraných premenných) a výťažok (odhadnutý z nárastu dĺžky hlavného výhonku a ďalších troch meraných

▼M7

premenných) pre ošetrené a neošetrené rastliny. Špecifická rýchlosť rastu (r) sa následne použije na stanovenie hodnoty E_rC_x (napr. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) a výťažok (y) na stanovenie hodnoty E_yC_x (napr. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}).

5. Okrem toho je možné štatisticky stanoviť najnižšiu koncentráciu s pozorovaným účinkom (LOEC) a koncentráciu bez pozorovaného účinku (NOEC).

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

6. Mala by byť k dispozícii analytická metóda s vhodnou citlivosťou na kvantifikáciu testovanej chemikálie v testovacom médiu. Informácie o testovanej chemikálii, ktoré môžu byť užitočné pri stanovovaní testovacích podmienok, zahŕňajú štruktúrny vzorec, čistotu a nečistoty, rozpustnosť vo vode, stabilitu vo vode a na svetle, disociačnú konštantu v kyseline (pK_a), rozdeľovaciu konštantu oktanol – voda (K_{ow}), tlak pary a biodegradovateľnosť. Rozpustnosť vo vode a tlak pary je možné použiť na výpočet Henryho konštanty, ktorá bude udávať, či je pravdepodobné, že počas testu dôjde k značným elimináciám testovanej chemikálie. To pomôže pri stanovení, či je potrebné prijať konkrétne opatrenia na kontrolu týchto eliminácií. Ak sú informácie o rozpustnosti a stabilite testovanej chemikálie neurčité, odporúča sa, aby sa vyhodnotili za podmienok testu, t. j. s rastovým médiom, teplotou a režimom osvetlenia použitými v teste.

7. Kontrola pH testovacieho média je mimoriadne dôležitá napríklad pri testovaní kovov alebo látok, ktoré sú hydrolyticky nestabilné. Ďalšie informácie o testovaných chemikáliách a ich fyzikálno-chemických vlastnostiach, ktoré sťažujú ich testovanie, sú uvedené v usmerňovacom dokumente OECD (5).

PLATNOSŤ TESTU

8. Na to, aby bol test platný, musí byť čas zdvojnásobenia dĺžky hlavného výhonku v kontrole kratší ako 14 dní. Pri použití médií a za podmienok testu uvedených v tejto testovacej metóde sa toto kritérium môže splniť s použitím statického alebo polostatického režimu testu.

9. Priemerný variačný koeficient pre výťažok na základe meraní čerstvej hmotnosti výhonku (teda od začatia testu po skončenie testu) a ďalších meraných premenných (pozri bod 37) v kontrolných kultúrach nepresahuje 35 % medzi replikátmi.

10. Viac ako 50 % replikátov z kontrolnej skupiny zostalo sterilných počas obdobia expozície 14 dní, čo znamená, že sú viditeľne bez kontaminácie inými organizmami, ako sú riasy, plesne a baktérie (číry roztok). *Poznámka:* Usmernenie na posúdenie sterility je uvedené v správe o kruhovom teste (4).

REFERENČNÁ CHEMIKÁLIA

11. Na overenie testovacieho postupu možno otestovať referenčnú chemikáliu (chemikálie), napríklad 3,5-dichlórfenol použitý v kruhovom teste (4). Priemerné hodnoty EC_{50} rôznych závislých premenných (pozri body 37 – 41 tejto testovacej metódy) pre 3,5-dichlórfenol sú podľa údajov z kruhového testu medzi 3,2 mg/l a 6,9 mg/l (údaje o intervale spoľahlivosti pre tieto hodnoty nájdete v správe o kruhovom teste). Odporúča sa testovať referenčnú chemikáliu najmenej dvakrát do roka alebo, ak sa testovanie vykonáva zriedkavejšie, súbežne so stanovením toxicity testovanej chemikálie.

▼M7

OPIS METÓDY

Testovacie vybavenie

12. Všetky zariadenia, ktoré prichádzajú do styku s testovacím médiom, by mali byť vyrobené zo skla alebo z iného chemicky inertného materiálu. Sklené nádoby používané na kultiváciu a testovanie by sa mali očistiť od chemických kontaminantov, ktoré by sa mohli lúhovať do testovacieho média, a mali by byť sterilné. Testovacie nádoby by mali byť dostatočne dlhé na to, aby výhonok v kontrolných nádobách mohol rásť vo vodnej fáze bez toho, aby na konci testu dosiahol povrch testovacieho média. Odporúča sa používať hrubostenné testovacie skúmavky z borokremičitého skla bez obruby s vnútorným priemerom približne 20 mm, dĺžkou približne 250 mm a s hliníkovými uzávermi.

13. Keďže upravené Andrewsovo médium obsahuje sacharózu (ktorá stimuluje rast plesní a baktérií), testovacie roztoky sa musia pripravovať v sterilných podmienkach. Všetky tekutiny i zariadenia sa pred použitím sterilizujú. Sterilizácia sa vykonáva vystavením horúcemu vzduchu (210 °C) na 4 hodiny alebo sterilizáciou v autokláve počas 20 minút pri teplote 121 °C. Okrem toho sa bezprostredne pred použitím všetky banky, podnosy, misky atď. a iné vybavenie sterilizujú plameňom na sterilnej pracovnej ploche.

14. Kultúry a testovacie nádoby by sa nemali uchovávať spoločne. To sa dá najlepšie dosiahnuť s použitím oddelených environmentálnych rastových komôr, inkubátorov alebo miestností. Osvetlenie a teplota by sa mali dať regulovať a udržiavať na konštantnej úrovni.

Testovací organizmus

15. Stolístok klasnatý (*Myriophyllum spicatum*) je ponorená vodná dvojklíčnolistová rastlina. Od júna do augusta vystupujú nad vodnú hladinu nevýrazné ružovobiele kvety. Rastliny sú zakorenené v zemi prostredníctvom systému mohutných pakoreňov a vyskytujú sa na celej severnej pologuli v eutrofických, ale neznečistených a vápenatejších stojatých vodách s bahnitým substrátom. *Myriophyllum spicatum* uprednostňuje sladkú vodu, ale možno ho nájsť aj v poloslanej vode.

16. Na test toxicity v systéme bez sedimentu sú potrebné sterilné rastliny. Ak testovacie laboratórium nemá pravidelné kultúry *Myriophyllum spicatum*, sterilný rastlinný materiál možno získať z iného laboratória, prípadne možno (nesterilný) rastlinný materiál nazbierať v teréne alebo objednať od komerčného dodávateľa. Ak rastliny pochádzajú z terénu, je potrebné naplánovať taxonomické overenie druhu. Ak sa rastliny nazbierajú v teréne alebo objednajú od komerčného dodávateľa, mali by sa sterilizovať (1) a minimálne osem týždňov pred použitím uchovávať v kultúre v rovnakom médiu, aké sa používa na testovanie. Terénne lokality použité na zber počiatočných kultúr nesmú obsahovať zrejmé zdroje kontaminácie. Treba dávať veľký pozor na to, aby sa pri zbere stolístka klasnatého v teréne získal správny druh, a to najmä v regiónoch, kde sa môže krížiť s inými druhmi rodu *Myriophyllum*. Ak sa materiál získa z iného laboratória, mal by sa takisto uchovávať minimálne tri týždne. V správe je vždy potrebné uviesť zdroj rastlinného materiálu a druh použitý na testovanie.

17. Kvalita a uniformita rastlín, ktoré sa používajú na test, budú mať značný vplyv na výsledok testu, preto by sa rastliny mali starostlivo vyberať. Použiť by sa mali mladé, rýchlo rastúce rastliny bez viditeľných lézií alebo straty farby (chlorózy). Podrobnosti o príprave testovacieho organizmu sú uvedené v dodatku 4.

Kultivácia

18. Na zníženie frekvencie údržby kultúr (napr. v čase, keď sa neplánujú žiadne testy s rodom *Myriophyllum*) sa kultúry môžu uchovávať pri obmedzenom osvetlení a teplote (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C). Informácie o kultivácii sú uvedené v dodatku 3.

▼M7

19. Najmenej 14 až 21 dní pred vykonaním testu sa dostatočné množstvo testovacích organizmov asepticky prenesie do čerstvého sterilného média a kultivuje sa 14 až 21 dní za podmienok testu ako predkultúra. Podrobnosti o príprave predkultúry sú uvedené v dodatku 4.

Testovacie médium

20. Pre druh *Myriophyllum spicatum* v testovacom systéme bez sedimentu sa odporúča iba jedno živné médium, ktoré je opísané v dodatku 2. Na kultiváciu a testovanie organizmu *Myriophyllum spicatum* sa odporúča použiť upravené Andrewsovo médium, ktoré je opísané v literatúre pod číslom (1). Upravené Andrewsovo médium sa vyrobí z piatich samostatne pripravených živných zásobných roztokov pridaním 3 % sacharózy. Podrobnosti o príprave média sú uvedené v dodatku 2.

21. Na získanie testovacích roztokov je potrebné desaťnásobne koncentrované upravené Andrewsovo médium (príprava riedením podľa potreby). Zloženie tohto média je uvedené v dodatku 2.

Testovacie roztoky

22. Testovacie roztoky sa zvyčajne pripravujú zriedením zásobného roztoku. Zásobné roztoky testovanej chemikálie sa spravidla pripravujú rozpustením chemikálie v demineralizovanej (teda destilovanej alebo deionizovanej) vode. Pridanie živín sa dosiahne použitím desaťnásobne koncentrovaného upraveného Andrewsovho média.

23. Zásobné roztoky testovanej chemikálie sa môžu sterilizovať v autokláve pri teplote 121 °C počas 20 minút alebo sterilnou filtráciou za predpokladu, že použitá metóda sterilizácie nevedie k denaturácii testovanej chemikálie. Testovacie roztoky sa môžu pripraviť aj v sterilnej demineralizovanej vode alebo médiu za sterilných podmienok. Pri výbere postupu sterilizácie zásobných roztokov testovanej chemikálie je nutné vziať do úvahy tepelnú stabilitu a adsorpciu na rôznych povrchoch. Z tohto dôvodu sa odporúča, aby sa zásobné roztoky pripravovali za sterilných podmienok, t. j. s použitím sterilného materiálu na rozpustenie testovanej chemikálie v sterilných podmienkach (napr. sterilizácia plameňom, odsávače s laminárnym prúdením atď.) v sterilnej vode. Táto technika prípravy sterilných zásobných roztokov sa vzťahuje na látky i zmesi.

24. Najvyššia testovaná koncentrácia testovanej chemikálie by spravidla nemala byť vyššia ako jej rozpustnosť vo vode za podmienok testu. Pre testované chemikálie s nízkou rozpustnosťou vo vode môže byť potrebné pripraviť koncentrovaný zásobný roztok alebo disperziu chemikálie s použitím organického rozpúšťadla alebo dispergantu, aby sa umožnilo pridanie presných množstiev testovanej chemikálie do testovacieho média a napomohlo sa jej rozptýlenie a rozpustenie. Použitiu takýchto materiálov sa treba v maximálnej možnej miere vyhýbať. Použitie pomocných rozpúšťadiel alebo dispergantov by nemalo viesť k žiadnej fytotoxicite. Medzi bežne používané rozpúšťadlá, ktoré nespôsobujú fytotoxicitu pri koncentráciách do 100 µl/l, patrí napríklad acetón a dimetylformamid. Ak sa používa rozpúšťadlo alebo dispergant, jeho konečná koncentrácia sa musí zaznamenať a udržiavať na minime (≤ 100 µl/l), pričom by všetky ovplyvňované a kontrolné vzorky mali obsahovať rovnakú koncentráciu rozpúšťadla alebo dispergantu. Ďalšie informácie o použití dispergantov sú uvedené v literatúre pod číslom (5).

Testovacie a kontrolné skupiny

25. Pri voľbe vhodných testovaných koncentrácií pomôžu predchádzajúce poznatky o toxicite testovanej chemikálie pre druh *Myriophyllum spicatum* z testu na vyhľadávanie rozsahu. V konečnom teste toxicity by spravidla malo byť päť (tak ako v teste inhibície rastu druhov rodu Lemna, kapitola C.26 tejto prílohy) až sedem testovaných koncentrácií usporiadaných v geometrickom rade. Mali by sa zvoliť tak, aby hodnoty NOEC a EC_{50} boli vnútri rozsahu koncentrácií (pozri ďalej). Rozdeľovací koeficient medzi

▼M7

testovanými koncentráciami by podľa možnosti nemal byť vyšší ako 3,2, môže sa však použiť aj vyššia hodnota, ak je krivka závislosti veličiny od koncentrácie plochá. Ak sa použije menej ako päť koncentrácií, je potrebné uviesť zdôvodnenie. Pre každú testovanú koncentráciu by sa malo použiť najmenej päť replikátov.

26. Pri stanovovaní rozsahu testovaných koncentrácií (v prípade testu na vyhľadávanie rozsahu a/alebo konečného testu toxicity) je potrebné zvážiť tieto okolnosti:

Na stanovenie hodnoty EC_x by testované koncentrácie mali obklopovať hodnotu EC_x, aby sa zabezpečila primeraná úroveň spoľahlivosti. Ak sa napríklad odhaduje hodnota EC_{50}, najvyššia testovaná koncentrácia by mala byť vyššia ako hodnota EC_{50}. Ak je hodnota EC_{50} mimo rozsahu testovaných koncentrácií, príslušné intervaly spoľahlivosti budú veľké a môže sa stať, že nebude možné správne posúdiť vhodnosť modelu na štatistické spracovanie.

Ak je cieľom odhad hodnôt LOEC/NOEC, najnižšia testovaná koncentrácia by mala byť dostatočne nízka na to, aby rast nebol významne nižší než v kontrole. Najvyššia testovaná koncentrácia by okrem toho mala byť dostatočne vysoká na to, aby bol rast významne nižší než v kontrole. Ak to tak nie je, test sa bude musieť zopakovať s použitím iného rozsahu koncentrácií (pokiaľ najvyššia koncentrácia nie je na úrovni limitu rozpustnosti alebo najvyššieho požadovaného koncentračného limitu, napr. 100 mg/l).

27. Každý test by mal zahŕňať kontroly s rovnakým živným médiom, testovacím organizmom (výber čo najhomogénnejšieho rastlinného materiálu, čerstvé bočné vetvy z predkultúr skrátené na 2,5 cm od základne), podmienkami prostredia a postupmi ako v prípade testovacích nádob, ale bez testovanej chemikálie. Ak sa používa pomocné rozpúšťadlo alebo dispergant, mala by sa pridať ďalšia kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/dispergantu v rovnakej koncentrácii ako v nádobách s testovanou chemikáliou. Počet replikátov kontrolných nádob (a v prípade potreby nádob s aplikáciou rozpúšťadla) by mal byť minimálne desať.

28. Ak sa nevyžaduje stanovenie hodnoty NOEC, koncepcia testu sa môže upraviť tak, že sa zvýši počet koncentrácií a zníži počet replikátov na koncentráciu. Kontrolných replikátov by však v každom prípade malo byť aspoň desať.

Expozícia

29. Čerstvé bočné vetvy z predkultúr skrátené na 2,5 cm od základne sa náhodne priradia do testovacích nádob za aseptických podmienok. Každá testovacia nádoba by mala obsahovať jednu 2,5 cm bočnú vetvu s apikálnym meristémom na jednom konci. Zvolený rastlinný materiál by mal mať v každej testovacej nádobe rovnakú kvalitu.

30. Testovacie nádoby sa v inkubátore musia rozmiestniť náhodne, aby sa minimalizoval vplyv priestorových rozdielov v intenzite svetla alebo teplote. Pri uskutočňovaní pozorovaní je takisto potrebné blokové usporiadanie alebo náhodné premiestňovanie nádob (alebo častejšie premiestňovanie).

31. Ak sa v predbežnom teste stability ukáže, že počas trvania testu (14 dní) nie je možné udržať koncentráciu testovanej chemikálie (t. j. meraná koncentrácia klesne pod 80 % nameranej počiatočnej koncentrácie), odporúča sa použiť polostatický režim testu. V takom prípade by sa rastliny mali vystaviť čerstvo pripraveným testovacím a kontrolným roztokom aspoň raz počas

▼M7

testu (napr. na 7. deň). Frekvencia vystavenia čerstvému médiu bude závisieť od stability testovanej chemikálie. V prípade veľmi nestabilných alebo prchavých chemikálií môže byť na zachovanie približne konštantných koncentrácií potrebná vyššia frekvencia.

32. Expozičný scenár aplikácie na listy (sprejom) sa v tejto testovacej metóde nenachádza.

Podmienky testu

33. Na zabezpečenie ľahkej intenzity ožiarenia v rozsahu približne 100 – 150 μE m^{-2} s^{-1} by sa malo použiť teplé a/alebo studené biele fluorescenčné svetlo, ktoré sa meria ako fotosynteticky aktívne žiarenie (400 – 700 nm) v bodoch, ktoré sa nachádzajú v rovnakej vzdialenosti od zdroja svetla ako dno testovacích nádob (ekvivalent približne 6 000 až 9 000 luxov), a pri použití cyklu svetla a tmy 16:8 hod. Metóda detekcie a merania svetla, najmä typ senzora, bude mať vplyv na meranú hodnotu. Guľové senzory (ktoré reagujú na svetlo zo všetkých uhlov nad a pod rovinou merania) a „kosínusové“ senzory (ktoré reagujú na svetlo zo všetkých uhlov nad rovinou merania) sa uprednostňujú pred jednosmernými senzormi a poskytnú vyššie hodnoty v prípade viacbodového zdroja svetla takého typu, aký sa uvádza v tejto metóde.

34. Teplota v testovacích nádobách by mala byť 23 °C ± 2 °C. V určitých prípadoch je potrebné venovať zvýšenú pozornosť kolísaniu pH, napríklad pri testovaní nestabilných chemikálií alebo kovov. Hodnota pH by mala zostať v rozsahu 6 – 9. Ďalšie informácie sú uvedené v literatúre pod číslom (5).

Trvanie

35. Test sa skončí 14 dní po premiestnení rastlín do testovacích nádob.

Merania a analytické stanovenia

36. Na začiatku testu je dĺžka hlavného výhonku testovacieho organizmu 2,5 cm (pozri bod 29). Meria sa pravítkom (pozri dodatok 4) alebo fotografickou a obrazovou analýzou. Dĺžka hlavného výhonku testovacieho organizmu, ktorý sa zdá normálny alebo abnormálny, sa musí stanoviť na začiatku testu, aspoň raz počas 14-dňového obdobia expozície a na konci testu. Poznámka: Ako alternatívu možno v prípade, že nie je k dispozícii obrazová analýza, a za predpokladu, že pracovná plocha sa pred vložením rastlín do testovacích nádob sterilizuje, použiť na odmeranie dĺžky hlavného výhonku na začiatku a počas testu sterilné pravítko. Treba zaznamenávať zmeny vo vývine rastliny, napr. deformácie výhonkov, zmeny vzhľadu, známky nekrózy, chlorózy, rozpadu alebo straty schopnosti plávať na hladine a zmeny v dĺžke a vo vzhľade koreňa. Zaznamenať by sa mali aj významné znaky testovacieho média (napr. prítomnosť nerozpusteného materiálu, rast rias, plesní a baktérií v testovacej nádobe).

37. Okrem stanovenia dĺžky hlavného výhonku počas testu by sa mali posúdiť aj účinky testovanej chemikálie na tri (alebo viac) z týchto meraných premenných:

i) celková dĺžka bočných vetiev;

ii) celková dĺžka výhonku;

iii) celková dĺžka koreňa;

iv) čerstvá hmotnosť;

v) suchá hmotnosť;

vi) počet praslenov.

▼M7

Poznámka č. 1: Pri výbere príslušných ďalších mier spomedzi šiestich uvedených premenných by mohli pomôcť pozorovania vykonané počas testu na vyhľadávanie rozsahu.

Poznámka č. 2: Stanovenie čerstvej a suchej hmotnosti (parametre iv a v) je veľmi žiaduce.

Poznámka č. 3: Vzhľadom na to, že sacharóza a svetlo (vystavenie koreňov svetlu počas testu) môžu mať vplyv na transportné nosiče auxínu (rastlinný rastový hormón) a že niektoré chemikálie môžu mať auxínový spôsob účinku, je zaradenie sledovaných parametrov koreňa (parameter iii) otázne.

Poznámka č. 4: Výsledky kruhového testu poukazujú na vysoké variačné koeficienty (> 60 %) pre celkovú dĺžku bočných vetiev (parameter i). Celková dĺžka bočných vetiev je v každom prípade zahrnutá do celkovej dĺžky výhonku (parameter ii), ktorá má prijateľnejšie variačné koeficienty < 30 %.

Poznámka č. 5: Vzhľadom na uvedené úvahy sa odporúčajú tieto hlavné merané parametre: celková dĺžka výhonku, čerstvá hmotnosť a suchá hmotnosť (parametre ii, iv a v). Použitie parametra vi (počet praslenov) sa necháva na posúdenie výskumného pracovníka.

38. Dĺžka hlavného výhonku a počet praslenov majú výhodu v tom, že ich možno stanoviť pre každý test a kontrolnú nádobu na začiatku testu, počas neho i na jeho konci fotografickou a obrazovou analýzou, hoci možno použiť aj (sterilné) pravítko.

39. Na konci expozície sa môže pravítkom odmerať celková dĺžka bočných vetiev, celková dĺžka koreňa (ako súčet všetkých bočných vetiev alebo koreňov) a celková dĺžka výhonku (ako súčet dĺžky hlavného výhonku a celkovej dĺžky bočných vetiev).

40. Čerstvú a/alebo suchú hmotnosť je potrebné stanoviť na začiatku testu zo vzorky predkultúry, ktorá predstavuje materiál použitý na začiatku testu, a na konci testu s použitím rastlinného materiálu z každej testovacej a kontrolnej nádoby.

41. Celkovú dĺžku bočných vetiev, celkovú dĺžku výhonku, celkovú dĺžku koreňa, čerstvú hmotnosť, suchú hmotnosť a počet praslenov možno stanoviť takto:

i) Celková dĺžka bočných vetiev: dĺžku bočných vetiev možno stanoviť odmeraním všetkých bočných vetiev pravítkom na konci expozície. Celková dĺžka bočných vetiev je súčet všetkých bočných vetiev pre každú testovaciu a kontrolnú nádobu.

ii) Celková dĺžka výhonku: dĺžku hlavného výhonku možno stanoviť obrazovou analýzou alebo pravítkom. Celková dĺžka výhonku je súčet celkovej dĺžky bočných vetiev a dĺžky hlavného výhonku pre každú testovaciu a kontrolnú nádobu na konci expozície.

iii) Celková dĺžka koreňa: dĺžku koreňa možno stanoviť odmeraním všetkých koreňov pravítkom na konci expozície. Celková dĺžka koreňa je súčet všetkých koreňov pre každú testovaciu a kontrolnú nádobu.

iv) Čerstvá hmotnosť: čerstvú hmotnosť možno stanoviť odvážením testovacích organizmov na konci expozície. Všetok rastlinný materiál z každej testovacej a kontrolnej nádoby sa opláchne destilovanou vodou a osuší

▼M7

celulózovým papierom. Po tejto príprave sa odvážením stanoví čerstvá hmotnosť. Počiatočné množstvo biomasy (čerstvá hmotnosť) sa stanovuje na základe vzorky testovacích organizmov odobratých z rovnakej vzorky, aká sa použila na inokuláciu testovacích nádob.

v) Suchá hmotnosť: po príprave na stanovenie čerstvej hmotnosti sa testovacie organizmy vysušia pri teplote 60 °C na konštantnú hmotnosť. Táto hmotnosť je suchá hmotnosť. Počiatočné množstvo biomasy (suchá hmotnosť) sa stanovuje na základe vzorky testovacích organizmov odobratých z rovnakej vzorky, aká sa použila na inokuláciu testovacích nádob.

vi) Počet praslenov: spočítajú sa všetky prasleny pozdĺž hlavného výhonku.

Frekvencia meraní a analytických stanovení

42. Ak sa použije statický test, na začiatku a na konci testu by sa mala odmerať hodnota pH každej ovplyvňovanej vzorky. Ak sa použije polostatický test, hodnota pH by sa mala odmerať v každej vzorke „čerstvého“ testovacieho roztoku pred každým obnovením a aj v zodpovedajúcich „použitých“ roztokoch.

43. Intenzita svetla by sa mala merať v rastovej komore, inkubátore alebo miestnosti v bodoch v rovnakej vzdialenosti od zdroja svetla ako testovacie organizmy. Merania by sa mali uskutočniť minimálne raz počas testu. Teplota média v náhradnej nádobe udržiavanej v rovnakých podmienkach v rastovej komore, inkubátore alebo miestnosti by sa mala zaznamenať minimálne raz za deň (alebo priebežne pomocou zapisovača údajov).

44. Počas testu sa v príslušných intervaloch stanovia koncentrácie testovanej chemikálie (chemikálií). Pri statických testoch je potrebné stanoviť koncentrácie minimálne na začiatku a na konci testu.

45. Pri polostatických testoch, kde sa očakáva, že koncentrácie testovanej chemikálie (chemikálií) nezostanú v rozsahu ± 20 % nominálnej koncentrácie, je potrebné analyzovať všetky čerstvo pripravené testovacie roztoky a rovnaké roztoky pri každom obnovení. V prípade testov, kde namerané počiatočné koncentrácie testovanej chemikálie (chemikálií) nie sú v rozsahu ± 20 % nominálnej hodnoty, ale kde existujú postačujúce dôkazy na preukázanie, že počiatočné koncentrácie sú opakovateľné a stabilné (t. j. v rozsahu 80 – 120 % počiatočnej koncentrácie), sa však stanovenia chemikálií môžu vykonať iba s najvyššími a najnižšími testovanými koncentráciami. Vo všetkých prípadoch je pred obnovením potrebné stanoviť testované koncentrácie iba v jednej replikačnej nádobe pre každú testovanú koncentráciu (alebo v obsahu nádob združených na základe opakovaní).

46. Ak je dokázané, že testovaná koncentrácia je počas testu v dostatočnej miere udržiavaná v rozsahu ± 20 % nominálnej alebo nameranej počiatočnej koncentrácie, analýza výsledkov sa môže zakladať na nominálnych alebo nameraných počiatočných hodnotách. Ak je odchýlka od nominálnej alebo nameranej počiatočnej koncentrácie väčšia ako ± 20 %, analýza výsledkov by sa mala zakladať na geometrickom priemere koncentrácií počas expozície alebo na modeloch opisujúcich pokles koncentrácie testovanej chemikálie (5).

Limitný test

47. V určitých situáciách, napr. keď z predbežného testu vyplýva, že testovaná chemikália nemá žiadne toxické účinky pri koncentráciách do 100 mg/l alebo do svojho limitu rozpustnosti v testovacom médiu, alebo v prípade prípravku do jeho limitu dispergovateľnosti, sa môže vykonať limitný test umožňujúci porovnanie reakcií v kontrolnej skupine a jednej ovplyvňovanej skupine (100 mg/l alebo koncentrácia rovná limitu rozpustnosti). Dôrazne sa odpo-

▼M7

rúča,
aby sa tento test podporil analýzou expozičnej koncentrácie. Na limitný test sa vzťahujú všetky uvedené podmienky testu a validačné kritériá s tou výnimkou, že počet ovplyvňovaných replikátov by sa mal zdvojnásobiť. Rast v kontrolnej a ovplyvňovanej skupine sa môže analyzovať s použitím štatistického testu na porovnanie priemerov, napr. Studentovho t-testu.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Závisle premenné

48. Účelom testu je stanoviť účinky testovanej chemikálie na vegetatívny rast druhu *Myriophyllum spicatum*. V tejto testovacej metóde sú opísané dve závisle premenné.

a) Priemerná špecifická rýchlosť rastu: táto závisle premenná sa vypočíta na základe zmien logaritmu dĺžky hlavného výhonku a navyše na základe zmien logaritmu iných meraných parametrov, teda celkovej dĺžky výhonku, čerstvej hmotnosti, suchej hmotnosti alebo počtu praslenov v čase (vyjadrených za deň) v kontrolách a v každej ovplyvňovanej skupine. Poznámka: V prípade meraných parametrov celkovej dĺžky bočných vetiev a celkovej dĺžky koreňa výpočet priemernej špecifickej rýchlosti rastu nie je možný. Na začiatku testu testovací organizmus nemá žiadne bočné vetvy ani korene (na základe prípravy z predkultúry). Výpočet priemernej špecifickej rýchlosti rastu začínajúci od hodnoty nula nie je definovaný.

b) Výťažok: táto závisle premenná sa vypočíta na základe zmien v dĺžke hlavného výhonku a navyše na základe zmien iných meraných parametrov – teda ideálne celkovej dĺžky výhonku, čerstvej hmotnosti, suchej hmotnosti alebo počtu praslenov a iných parametrov, ak sa to považuje za užitočné – v kontrolách a v každej ovplyvňovanej skupine až do konca testu.

49. Odhady toxicity by sa mali zakladať na dĺžke hlavného výhonku a ďalších troch meraných premenných (teda ideálne celkovej dĺžke výhonku, čerstvej hmotnosti, suchej hmotnosti alebo počte praslenov, pozri bod 37 a poznámky 2, 4 a 5 k tomuto odseku), lebo niektoré chemikálie môžu ovplyvniť iné merané premenné oveľa viac ako dĺžku hlavného výhonku. Tento účinok by nebolo možné stanoviť iba na základe výpočtu dĺžky hlavného výhonku.

Priemerná špecifická rýchlosť rastu

50. Priemerná špecifická rýchlosť rastu za konkrétne obdobie sa vypočíta ako logaritmus nárastu premenných rastu – dĺžky hlavného výhonku a troch ďalších meraných premenných (teda celkovej dĺžky výhonku, čerstvej hmotnosti, suchej hmotnosti alebo počtu praslenov) – s použitím vzorca uvedeného ďalej pre každý replikát kontroly a ovplyvňované vzorky:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

kde:

μ_{i-j}: priemerná špecifická rýchlosť rastu od času i do času j,

N_i: meraná premenná v testovacej alebo kontrolnej nádobe v čase i,

N_j: meraná premenná v testovacej alebo kontrolnej nádobe v čase j,

t: časové obdobie medzi i a j.

▼M7

Pre každú testovanú a ovplyvňovanú skupinu sa vypočíta priemerná hodnota rýchlosti rastu spolu s odhadmi rozptylu.

51. Priemerná špecifická rýchlosť rastu by sa mala vypočítať pre celé obdobie testu (čas „i“ v uvedenom vzorci je začiatok testu a čas „j“ je koniec testu). Pre každú testovanú koncentráciu a kontrolnú vzorku sa vypočíta priemerná hodnota priemernej špecifickej rýchlosti rastu spolu s odhadmi rozptylu. Okrem by sa mala posúdiť fázová rýchlosť rastu, aby sa vyhodnotili účinky testovanej chemikálie, ktoré sa vyskytnú počas obdobia expozície (napr. skontrolovaním logaritmicky transformovaných rastových kriviek).

52. Pre každú testovanú koncentráciu (ovplyvňovanú skupinu) sa potom môže vypočítať percentuálna inhibícia rýchlosti rastu (I_r) podľa tohto vzorca:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

kde:

% I_r: percentuálna inhibícia priemernej špecifickej rýchlosti rastu,

μ_C: priemerná hodnota pre μ v kontrole,

μ_T: priemerná hodnota pre μ v ovplyvňovanej skupine.

Výťažok

53. Účinky na výťažok sa stanovia na základe meranej premennej dĺžky hlavného výhonku a troch ďalších meraných premenných (teda ideálne celkovej dĺžky výhonku, čerstvej hmotnosti, suchej hmotnosti alebo počtu praslenov) získaných v každej testovacej nádobe na začiatku a na konci testu. Pre čerstvú hmotnosť a suchú hmotnosť sa počiatočné množstvo biomasy stanoví na základe vzorky testovacích organizmov odobratých z rovnakej vzorky, aká sa použila na inokuláciu testovacích nádob. Pre každú testovanú koncentráciu a kontrolu sa vypočíta priemerná hodnota výťažku spolu s odhadmi rozptylu. Pre každú ovplyvňovanú skupinu sa môže vypočítať priemerná percentuálna inhibícia výťažku (% I_y) takto:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

kde:

% I_y: percento zníženia výťažku,

b_C: rozdiel konečného množstva biomasy a počiatočného množstva biomasy pre kontrolnú skupinu,

b_T: rozdiel konečného množstva biomasy a počiatočného množstva biomasy v ovplyvňovanej skupine.

Čas zdvojnásobenia

54. Na stanovenie času zdvojnásobenia (T_d) dĺžky hlavného výhonku a dodržania tohto validačného kritéria (pozri bod 8) sa použije tento vzorec s údajmi, ktoré sa získali z kontrolných nádob:

$T_d = \ln 2/\mu$

kde μ je priemerná špecifická rýchlosť rastu stanovená postupom opísaným v bodoch 50 – 52.

▼M7

Zakreslenie kriviek závislosti veličiny od koncentrácie

55. Je potrebné zostrojiť krivky závislosti veličiny od koncentrácie pre vzťah medzi priemernou percentuálnou inhibíciou závisle premennej (I_r alebo I_y vypočítané podľa bodu 53) a logaritmom koncentrácie testovanej chemikálie.

Odhad hodnoty EC_x

56. Odhady hodnoty EC_x by sa mali zakladať na hodnotách priemernej špecifickej rýchlosti rastu (E_rC_x) a výťažku (E_yC_x), z ktorých každá by sa zase mala zakladať na dĺžke hlavného výhonku, prípadne na ďalších meraných premenných (teda ideálne celkovej dĺžke výhonku, čerstvej hmotnosti, suchej hmotnosti alebo počte praslenov). Dôvodom je skutočnosť, že existujú chemikálie, ktoré rozdielne vplývajú na dĺžku hlavného výhonku a iné merané premenné. Požadovanými parametrami toxicity sú teda štyri hodnoty EC_x pre každú vypočítanú úroveň inhibície x: E_rC_x (dĺžka hlavného výhonku); E_rC_x (ideálne celková dĺžka výhonku, čerstvá hmotnosť, suchá hmotnosť alebo počet praslenov), E_yC_x (dĺžka hlavného výhonku) a E_yC_x (t. j. ideálne celková dĺžka výhonku, čerstvá hmotnosť, suchá hmotnosť alebo počet praslenov).

57. Treba si uvedomiť, že hodnoty EC_x vypočítané s použitím týchto dvoch závisle premenných nie sú porovnateľné a tento rozdiel treba zohľadniť pri použití výsledkov testu. Hodnoty EC_x založené na priemernej špecifickej rýchlosti rastu (E_rC_x) budú vo väčšine prípadov vyššie ako výsledky založené na výťažku (E_yC_x) – ak boli dodržané podmienky tejto testovacej metódy – vzhľadom na matematický základ príslušných metód. Tento rozdiel by sa nemal vysvetľovať ako rozdiel v citlivosti medzi týmito dvoma závisle premennými, ale len tak, že hodnoty sa odlišujú matematicky.

Štatistické postupy

58. Cieľom je získať kvantitatívny vzťah medzi koncentráciou a závisle premennou pomocou regresnej analýzy. Možno použiť váženú lineárnu regresiu po vykonaní linearizujúcej transformácie údajov reakcie, napríklad s použitím probitového, logitového alebo Weibullovho modelu (7), ale uprednostňujú sa techniky nelineárnej regresie, ktorými sa lepšie spracujú nevyhnutné nepravidelnosti údajov a odchýlky od hladkých rozdelení. Tieto nepravidelnosti, ak sa blížia k nulovej alebo úplnej inhibícii, sa transformáciou môžu zväčšiť a ovplyvniť analýzu (7). Treba si uvedomiť, že štandardné metódy analýzy s použitím probitovej, logitovej alebo Weibullovej transformácie sú určené na použitie na kvantálne údaje (napr. o úmrtnosti alebo prežití) a mali by sa upraviť tak, aby sa prispôsobili údajom o rýchlosti rastu alebo výťažku. Osobitné postupy na stanovenie hodnôt EC_x z kontinuálnych údajov možno nájsť v literatúre pod číslami (8) (9) a (10).

59. Pre každú závisle premennú, ktorá sa má analyzovať, sa na výpočet bodových odhadov hodnôt EC_x použije vzťah medzi koncentráciou a reakciou na ňu. Ak je to možné, je potrebné stanoviť 95 % hranice spoľahlivosti pre každý odhad. Dobrú zhodu údajov týkajúcich sa reakcie s regresným modelom je potrebné vyhodnotiť graficky alebo štatisticky. Regresná analýza by sa mala vykonať s použitím reakcií jednotlivých replikátov, nie priemerných hodnôt ovplyvňovanej skupiny.

60. Odhady hodnoty EC_{50} a hranice spoľahlivosti sa môžu získať aj s použitím lineárnej interpolácie metódou „bootstrap“ (10), ak sú dostupné regresné modely/metódy nevhodné pre dané údaje.

61. Na účely odhadu hodnôt LOEC, a teda aj NOEC, je potrebné porovnať priemerné hodnoty ovplyvňovaných skupín metódami analýzy rozptylu (ANOVA). Priemerná hodnota pre každú koncentráciu sa potom porovná s priemernou hodnotou kontroly s použitím príslušnej metódy mnohonásobného porovnania alebo testovania trendov. Môže sa použiť Dunnettov alebo Williamsov test (12) (13) (14) (15) (16). Treba posúdiť, či je dodržaný predpoklad homogenity rozptylov pre analýzu ANOVA. Toto posúdenie sa

▼M7

môže vykonať graficky alebo formálnym testom (15). Vhodné testy sú Levenov alebo Bartlettov test. Nesplnenie predpokladu homogenity rozptylov je niekedy možné korigovať logaritmickou transformáciou údajov. Ak je heterogenita rozptylov extrémna a nie je možné ju korigovať transformáciou, treba uvažovať o analýze metódami, ako sú napríklad Jonckheerov-Terpstrove testy trendu. Ďalšie informácie o stanovení hodnoty NOEC možno nájsť v literatúre pod číslom (10).

62. Najnovší vývoj vo vede vedie k odporúčaniu upustiť od koncepcie NOEC a nahradiť ju bodovými odhadmi hodnoty EC_x na základe regresie. Príslušná hodnota x pre tento test s rodom *Myriophyllum* nebola stanovená. Vhodný sa však zdá rozsah 10 – 20 % (v závislosti od zvolenej závisle premennej), pričom ideálne by sa mali uvádzať hodnoty EC_{10} i EC_{20} a ich hranice spoľahlivosti.

Prezentovanie výsledkov

63. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália:

Jednozložkové látky:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď. (vrátane obsahu organicky viazaného uhlíka, ak to je vhodné).

Viaczložkové látky, UVCB alebo zmesi:

— charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Testovací druh

— vedecký názov a zdroj.

Podmienky testu

— použitý testovací postup (statický alebo polostatický),

— dátum začiatku testu a jeho dĺžka,

— testovacie médium,

— opis návrhu pokusu: testovacie nádoby a veká, objemy roztokov, dĺžka hlavného výhonku na testovaciu nádobu na začiatku testu,

— testované koncentrácie (nominálne a merané podľa potreby) a počet replikátov na koncentráciu,

— metódy prípravy zásobných a testovacích roztokov vrátane prípadného použitia rozpúšťadiel alebo dispergantov,

— teplota počas testu,

— zdroj svetla, intenzita a homogenita svetla,

— hodnoty pH testovacieho a kontrolného média,

— metóda analýzy testovanej chemikálie s príslušným údajmi posúdenia kvality (validačné štúdie, štandardné odchýlky alebo hranice spoľahlivosti analýz),

▼M7

— metódy stanovenia dĺžky hlavného výhonku a iných meraných premenných, napr. celkovej dĺžky bočných vetiev, celkovej dĺžky výhonku, celkovej dĺžky koreňa, čerstvej hmotnosti, suchej hmotnosti a počtu praslenov,

— stav kultúry (sterilná alebo nesterilná) v každej testovacej a kontrolnej nádobe pri každom pozorovaní,

— všetky odchýlky od tejto testovacej metódy.

Výsledky

— Nespracované údaje: dĺžka hlavného výhonku a iné merané premenné v každej testovacej a kontrolnej nádobe pri každom pozorovaní a analýze,

— priemery a štandardné odchýlky pre každú meranú premennú,

— krivky rastu pre každú meranú premennú,

— vypočítané hodnoty závisle premenných pre každý ovplyvňovaný replikát s priemernými hodnotami a variačným koeficientom pre replikáty,

— grafické znázornenie vzťahu koncentrácie a účinku,

— odhady sledovaných parametrov toxicity pre závisle premenné, napr. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, a príslušné intervaly spoľahlivosti, hodnoty LOEC a/alebo NOEC (ak sa vypočítavajú) a štatistické metódy použité na ich stanovenie,

— ak sa použila metóda ANOVA, veľkosť účinku, ktorý možno zistiť (napr. najmenej významný rozdiel),

— každá stimulácia rastu zistená v akejkoľvek ovplyvňovanej vzorke,

— všetky viditeľné znaky fytotoxicity, ako aj pozorovania testovacích roztokov,

— rozbor výsledkov vrátane prípadného vplyvu odchýlok od tejto testovacej metódy na výsledok testu.

LITERATÚRA

(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.

(2) Maletzki, D. *et al.* (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch*, No. 22, pp. 702–710.

(3) *Kapitola C.26 tejto prílohy: Druhy rodu Lemna, test inhibície rastu*.

(4) OECD (2014), „*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris.

(5) OECD (2000), „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

(6) Kapitola C.51 tejto prílohy: Test toxicity pre *Myriophyllum spicatum* v systéme voda – sediment

▼**M7**

(7) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.

(8) Nyholm, N. *et al*. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/2, pp. 157-167.

(9) 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.

(10) OECD (2006), „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

(11) 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.

(12) 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.

(13) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.

(14) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(15) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.

(16) 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

Dodatok 1

DEFINÍCIE

Biomasa je čerstvá a/alebo suchá hmotnosť živej hmoty nachádzajúcej sa v populácii. V tomto teste je biomasa súhrn hlavného výhonku, všetkých bočných vetiev a všetkých koreňov.

Chemikália je látka alebo zmes.

Chloróza je zmena farby testovacieho organizmu, najmä praslenov, zo zelenej na žltkastú.

ECx je koncentrácia testovanej chemikálie rozpustenej v testovacom médiu, ktorej dôsledkom je x % (napr. 50 %) zníženie rastu rastliny druhu. *Myriophyllum spicatum* v rámci stanoveného obdobia expozície (je potrebné výslovne uviesť, ak sa odchyľuje od celkového alebo bežného trvania testu). Na jednoznačné označenie hodnoty EC odvodenej od rýchlosti rastu alebo výťažku sa používa symbol „E_rC“ pre rýchlosť rastu a symbol „E_yC“ pre výťažok, potom nasleduje použitá meraná premenná, napr. „E_rC“ (dĺžka hlavného výhonku).

Rast je nárast meranej premennej, napr. dĺžky hlavného výhonku, celkovej dĺžky bočných vetiev, celkovej dĺžky výhonku, celkovej dĺžky koreňa, čerstvej hmotnosti, suchej hmotnosti alebo počtu praslenov, počas obdobia testu.

Rýchlosť rastu (priemerná špecifická rýchlosť rastu) je logaritmický nárast meranej premennej počas obdobia expozície. *Poznámka*: Závisle premenné súvisiace s rýchlosťou rastu sú nezávislé od trvania testu, pokiaľ je rastový model nevystavených kontrolných organizmov exponenciálny.

Najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC) je najnižšia testovaná koncentrácia, pri ktorej sa pozoruje štatisticky významný účinok chemikálie na zníženie rastu (pri $p < 0,05$) v porovnaní s kontrolou v rámci daného obdobia expozície. Škodlivý účinok všetkých testovaných koncentrácií vyšších ako hodnota LOEC by však mal byť rovnaký alebo väčší ako účinky pozorované pri hodnote LOEC. Ak nie sú splnené tieto dve podmienky, je potrebné poskytnúť úplné vysvetlenie, akým spôsobom sa zvolila hodnota LOEC (a teda aj NOEC).

Merané premenné sú všetky druhy premenných, ktoré sa merajú na vyjadrenie sledovaného parametra testu s použitím jednej alebo viacerých závisle premenných. V tejto testovacej metóde sú merané premenné dĺžka hlavného výhonku, celková dĺžka bočných vetiev, celková dĺžka výhonku, celková dĺžka koreňa, čerstvá hmotnosť, suchá hmotnosť a počet praslenov.

Monokultúra je kultúra s jedným druhom rastliny.

Nekróza je odumreté (t. j. biele alebo tmavohnedé) tkanivo testovacieho organizmu.

Koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC) je testovaná koncentrácia bezprostredne pod úrovňou hodnoty LOEC.

Závisle premenná je premenná slúžiaca na odhadnutie toxicity, ktorá bola odvodená z akejkoľvek meranej premennej opisujúcej biomasu rôznymi metódami výpočtu. V tejto testovacej metóde sú závisle premennými rýchlosť rastu a výťažok, ktoré sú odvodené z meraných premenných, ako sú dĺžka hlavného výhonku, celková dĺžka výhonku, čerstvá hmotnosť, suchá hmotnosť alebo počet praslenov.

Polostatický (obnovovací) test je test, v ktorom sa testovací roztok počas testu pravidelne vymieňa v stanovených intervaloch.

Statický test je testovacia metóda bez obnovy testovacieho roztoku počas testu.

▼M7

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Sledovaný parameter testu je všeobecný faktor, ktorý sa v dôsledku testovanej chemikálie bude meniť v porovnaní s kontrolou ako cieľ testu. V prípade tejto testovacej metódy je sledovaným parametrom testu inhibícia rastu, ktorá sa dá vyjadriť rôznymi závisle premennými založenými na jednej alebo viacerých meraných premenných.

Testovacie médium je kompletné syntetické rastové médium, v ktorom rastú testovacie rastliny vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie. Testovaná chemikália sa v testovacom médiu spravidla rozpustí.

UVCB je látka neznámeho alebo variabilného zloženia, produkt komplexných reakcií alebo biologický materiál.

Výťažok je rozdiel hodnoty meranej premennej, ktorá vyjadruje množstvo biomasy, na konci obdobia expozície a hodnoty meranej premennej na začiatku obdobia expozície. Poznámka: Ak je rastový model nevystavených organizmov exponenciálny, závisle premenné založené na výťažku sa budú s dĺžkou trvania testu znižovať.

▼M7

Dodatok 2

UPRAVENÉ ANDREWSOVO MÉDIUM NA ZÁSOBNÚ KULTÚRU A PREDKULTÚRU

Z piatich samostatne pripravených živných zásobných roztokov sa pripraví upravené Andrewsovo médium potrebné na zásobnú kultúru a predkultúru pridaním 3 % sacharózy.

Tabuľka 1

Zloženie Andrewsovho živného roztoku: (označenie ASTM E 1913-04)

Výroba živných zásobných roztokov			Výroba živného roztoku
Zásobný roztok	Chemikália	Počiatočná hmotnosť na 1 000 ml	ml na 5 l živného roztoku
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	Pozri zásobný roztok 3.1 ďalej.		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	

Zásobné roztoky možno uchovávať v chladničke 6 mesiacov (pri teplote 5 – 10 °C). Jedine zásobný roztok č. 5 má nižší čas použiteľnosti (dva mesiace).

Tabuľka 2

Výroba zásobného roztoku 3.1 na prípravu zásobného roztoku 3

Chemikália	Počiatočná hmotnosť 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

Po vytvorení zásobného roztoku 3.1 (tabuľka 2) tento roztok hlboko zmrazte v alikvotných častiach po približne 11 ml (pri teplote aspoň – 18 °C). Hlboko zmrazené časti majú čas použiteľnosti päť rokov.

Na výrobu zásobného roztoku 3 rozmrazte zásobný roztok 3.1, prelejte z neho 10 ml do 1 l kalibrovanej odmernej banky a pridajte ultračistú vodu až po mierku banky.

Na získanie upraveného Andrewsovho média nalejte približne 2 500 ml ultračistej vody do 5 l kalibrovanej odmernej banky. Pridajte 50 ml z každého zásobného roztoku, doplňte ultračistú vodu do 90 % kalibrovanej odmernej banky a upravte hodnotu pH na 5,8.

▼M7

Potom pridajte 150 g rozpustenej sacharózy (3 % na 5 l) a doplňte do kalibrovanej odmernej banky ultračistú vodu až po mierku. Nakoniec sa živný roztok naplní do 1 l Schottových baniek a sterilizuje v autokláve pri teplote 121 °C počas 20 minút.

Takto získaný živný roztok možno uchovávať sterilný v chladničke (pri teplote 5 – 10 °C) tri mesiace.

Upravené Andrewsovo médium na test toxicity v systéme bez sedimentu

Z piatich živných zásobných roztokov uvedených v tabuľkách 1 a 2 sa pripraví desaťkrát koncentrované upravené Andrewsovo médium potrebné na získanie testovacích roztokov pridaním 30 % sacharózy. Na jeho získanie nalejte približne 100 ml ultračistej vody do 1 l kalibrovanej odmernej banky. Pridajte 100 ml z každého zásobného roztoku a upravte hodnotu pH na 5,8. Potom pridajte 30 % rozpustenú sacharózu (300 g na 1 000 ml) a doplňte do kalibrovanej odmernej banky ultračistú vodu až po mierku.

Nakoniec sa živný roztok naplní do 0,5 l Schottových baniek a sterilizuje v autokláve pri teplote 121 °C počas 20 minút.

Takto získaný desaťkrát koncentrovaný upravený živný roztok možno uchovávať sterilný v chladničke (pri teplote 5 – 10 °C) tri mesiace.

▼M7

Dodatok 3

UDRŽIAVANIE ZÁSOBNEJ KULTÚRY

V tomto dodatku 3 je opísaná zásobná kultúra druhu *Myriophyllum spicatum* L ([1]), ponorenej vodnej dvojklíčnolistovej rastliny z čeľade zrnulkovité. Od júna do augusta vystupujú nad vodnú hladinu nevýrazné ružovobiele kvety. Rastliny sú zakorenené v zemi prostredníctvom systému mohutných pakoreňov a vyskytujú sa na celej severnej pologuli v eutrofických, ale neznečistených a vápenatejších stojatých vodách s bahnitým substrátom. *Myriophyllum spicatum* uprednostňuje sladkú vodu, ale možno ho nájsť aj v poloslanej vode.

Na zásobnú kultúru bez sedimentu v laboratórnych podmienkach sú potrebné sterilné rastliny. Sterilné rastliny sú k dispozícii od ekotoxikologického laboratória nemeckej Spolkovej agentúry pre životné prostredie (Umweltbundesamt).

Alternatívne možno testovacie organizmy pripraviť z nesterilných rastlín v súlade s označením ASTM E 1913-04. V ďalšej časti textu nájdete úryvok zo štandardného usmernenia ASTM s postupom kultivácie rastliny druhu *Myriophyllum sibiricum* nazbieranej v teréne:

„Ak chcete použiť nesterilné rastliny nazbierané v teréne, nazbierajte zimné výhonky *M. sibiricum* na jeseň. Umiestnite zimné výhonky do 20 l akvária obsahujúceho 5 cm vrstvu sterilného sedimentu, ktorá je pokrytá kremičitým pieskom alebo napríklad produktom Turface® a 18 l reagenčnej vody. Akvárium prevzdušňujte a udržiavajte pri teplote 15 °C a rýchlosti toku častíc 200 až 300 μmol m^{-2} s^{-1} počas 16 hodín denne. Rastlinnú kultúru v akváriu možno udržiavať ako rezervný zdroj rastlín pre prípad zničenia sterilných rastlinných kultúr mechanickou poruchou rastovej komory, kontamináciou alebo z iného dôvodu. Rastliny pestované v akváriu nie sú sterilné a sterilné kultúry nemožno udržiavať v kultivačnom systéme na produkciu vzoriek. Na účely sterilizácie kultúry sa rastliny vyberú z akvária a oplachujú v tečúcej deionizovanej vode približne 0,5 hodiny. Rastliny sa dezinfikujú za aseptických podmienok v komore s laminárnym prúdením vzduchu počas menej ako 20 minút (kým väčšina rastlinného tkaniva nie je odfarbená a len rastúci vrchol je stále zelený) v 3 % (w/v) roztoku chlórnanu sodného obsahujúcom 0,01 % vhodného surfaktantu. Premiešajte dezinfekčný prostriedok a rastlinný materiál. Segmenty s viacerými kolienkami sa prenesú do sterilných kultivačných skúmaviek obsahujúcich 45 ml sterilizovaného upraveného Andrewsovho média, ktoré sa uzavrú bežnými uzávermi kultivačných skúmaviek. Do každej testovacej komory sa umiestni len jeden segment rastliny. Na zabezpečenie uzavretia kultivačnej nádoby sa použije laboratórna tesniaca fólia. Keď sa vytvorila sterilná kultúra, segmenty rastliny obsahujúce viaceré kolienka by sa každých desať až dvanásť dní mali prenášať do nových testovacích komôr s čerstvým tekutým živným médiom. Ako sa preukázalo kultiváciou na agarových miskách, rastliny musia zostať sterilné osem týždňov predtým, ako možno začať s testovaním.“

Keďže upravené Andrewsovo médium obsahuje sacharózu (ktorá stimuluje rast plesní a baktérií), všetok materiál, roztoky a rastové médiá sa musia pripravovať v sterilných podmienkach. Všetky tekutiny i zariadenia sa pred použitím sterilizujú. Sterilizácia sa vykonáva vystavením horúcemu vzduchu (210 °C) na 4 hodiny alebo sterilizáciou v autokláve počas 20 minút pri teplote 121 °C. Okrem toho sa bezprostredne pred použitím všetky banky, podnosy, misky atď. a iné vybavenie sterilizujú plameňom na sterilnej pracovnej ploche.

Zásobné kultúry sa môžu uchovávať pri zníženom osvetlení a teplote (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C) aj počas dlhšieho obdobia bez toho, aby sa museli znova pripravovať. Rastové médium pre rastliny rodu *Myriophyllum* má byť rovnaké ako to, ktoré sa používa na testovanie, ale na zásobné kultúry sa môžu použiť aj iné médiá bohaté na živiny.

([1]) Carl von Linné (* 23. mája 1707, Råshult /Älmhult; † 10. januára1778, Uppsala).

▼M7

Segmenty rastliny sa rozložia axenicky do niekoľkých 500 ml Erlenmeyerových baniek naplnených 450 ml upraveného Andrewsovho média, resp. a/alebo 2 000 ml Fernbachových baniek naplnených 1 000 ml upraveného Andrewsovho média. Banky sa potom axenicky uzatvoria celulózovou zátkou.

Okrem toho je bezprostredne pred použitím absolútne nevyhnutné vybavenie dôkladne sterilizovať plameňom na sterilnej pracovnej ploche. V závislosti od počtu a veľkosti sa rastliny premiestňujú do čerstvého živného roztoku približne každé tri týždne.

Na túto obnovenú kultúru možno použiť vrcholy i segmenty strednej časti stonky. Počet a veľkosť premiestnených rastlín (alebo segmentov rastlín) závisia od toho, koľko rastlín je potrebných. Môžete napríklad preniesť päť segmentov výhonku do jednej Fernbachovej banky a tri segmenty výhonku do jednej Erlenmeyerovej banky, každý s dĺžkou 5 cm. Všetky časti s koreňmi, kvitnúce, mŕtve alebo inak podozrivé časti zlikvidujte.

Obrázok 1

Narezanie rastlín na zásobnú kultúru a predkultúru po 3 týždňoch kultivácie.



Kultivácia rastlín sa má vykonať v 500 ml Erlenmeyerových bankách a 2 000 ml Fernbachových bankách v chladiacom inkubátore pri teplote 20 ± 2 °C s nepretržitým svetlom s intenzitou približne 100 – 150 µE m^{-2} s^{-1} alebo 6 000 – 9 000 luxov (vyžarovaným osvetlením komory s teplotou farby „teplé biele svetlo“).

Obrázok 2

Kultivácia rastlín v chladiacom inkubátore s osvetlením komory.



Mali by sa použiť chemicky čisté (umyté v kyseline) a sterilné sklenené kultivačné nádoby a techniky aseptickej manipulácie. V prípade kontaminácie zásobnej kultúry, napr. riasami, plesňami a/alebo baktériami, by sa mala pripraviť nová kultúra alebo by sa na obnovu danej kultúry mala použiť zásobná kultúra z iného laboratória.

▼M7

Dodatok 4

UDRŽIAVANIE PREDKULTÚRY A PRÍPRAVA TESTOVACIEHO ORGANIZMU NA TESTOVANIE

Na získanie predkultúry narežte výhonky zo zásobnej kultúry na segmenty po dvoch praslenoch a vložte segmenty do Fernbachových baniek naplnených upraveným Andrewsovým médiom (s 3 % sacharózou). Každá banka môže obsahovať až 50 segmentov výhonkov. Treba však dbať na to, aby segmenty boli životaschopné a nemali žiadne korene a bočné vetvy ani ich pupene (pozri obrázok 1 v dodatku 3).

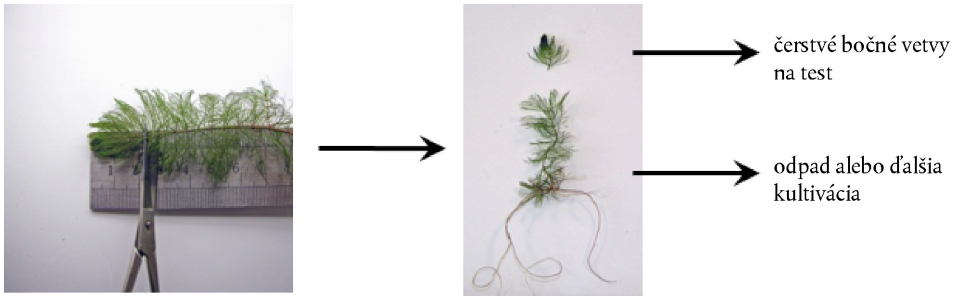
Organizmy v predkultúre sa kultivujú 14 až 21 dní v sterilných podmienkach v environmentálnej komore so striedavými fázami svetla/tmy 16/8 hodín. Intenzita svetla má byť v rozsahu 100 – 150 µE m^{-2} s^{-1}. Teplota v testovacích nádobách má byť 23 ± 2 °C.

Keďže upravené Andrewsovo médium obsahuje sacharózu (ktorá stimuluje rast rias, plesní a baktérií), roztoky testovanej chemikálie by sa mali pripravovať a kultivovať v sterilných podmienkach. Všetky tekutiny i zariadenia sa pred použitím sterilizujú. Sterilizácia sa vykonáva vystavením horúcemu vzduchu (210 °C) na 4 hodiny alebo sterilizáciou v autokláve počas 20 minút pri teplote 121 °C. Okrem toho sa bezprostredne pred použitím všetky banky, podnosy, misky atď. a iné vybavenie sterilizujú plameňom na sterilnej pracovnej ploche.

Výhonky sa axenicky vyberú z baniek s predkultúrou, pričom sa vyberie materiál, ktorý je čo najhomogénnejší. Každé testovanie si vyžaduje aspoň 60 testovacích organizmov (testovanie s ôsmimi koncentráciami testovanej chemikálie). Na testovanie vyberte z predkultúr čerstvé bočné vetvy, skráťte ich na 2,5 cm od základne (merané pomocou pravítka) a preneste ich do kadičky obsahujúcej sterilné upravené Andrewsovo médium. Tieto čerstvé bočné vetvy sa môžu použiť na test toxicity pre *Myriophyllum spicatum* v systéme bez sedimentu.

Obrázok 2

Narezanie rastlín z predkultúry na účely testu toxicity pre *Myriophyllum spicatum* v systéme bez sedimentu.



▼M7

C.51. TEST TOXICITY PRE *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* V SYSTÉME VODA – SEDIMENT

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 239 (2014). Testovacie metódy sú už k dispozícii pre plávajúce jednoklíčnolistové vodné rastliny druhov rodu *Lemna* (1) a pre druhy rias (2). Tieto metódy sa bežne používajú na získavanie údajov o rizikách testovaných chemikálií, najmä chemikálií s herbicídnymi účinkami, na necieľové vodné druhy rastlín. V niektorých prípadoch však môžu byť potrebné údaje o ďalších makrofytných druhoch. V najnovšom usmernení uverejnenom zo semináru o posúdení rizík pesticídov pre vodné makrofyty (Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides – AMRAP) Spoločnosti pre environmentálnu toxikológiu a chémiu (Society of Environmental Toxicology and Chemistry – SETAC) sa navrhlo, aby v prípade, že je známe, že druhy rodu *Lemna* a riasy nie sú citlivé na spôsob účinku testovaných chemikálií, alebo ak existujú obavy z rozdeľovania do sedimentu vedúcemu k expozícii prostredníctvom koreňovej absorpcie, bolo možné vyžadovať údaje pre zakorenené druhy makrofytov (3). Na základe súčasného poznania a skúseností boli ako uprednostňované druhy v prípadoch, keď sa vyžadujú údaje pre ponorené zakorenené dvojklíčnolistové druhy, vybrané druhy rodu *Myriophyllum* (4) (5) (6). Týmto testom sa nenahrádzajú iné testy vodnej toxicity, ale mali by sa ním skôr dopĺňať, a tak umožniť úplnejšie posúdenie nebezpečenstva a rizika pre vodné rastliny. Testovacia metóda v systéme voda – sediment pre druh *Myriophyllum spicatum* dopĺňa test toxicity pre *Myriophyllum spicatum* v systéme bez sedimentu (7).

2. V tomto dokumente sa opisuje testovacia metóda, ktorá umožňuje vyhodnotiť účinky testovanej chemikálie na zakorenený vodný rastlinný druh *Myriophyllum spicatum* rastúci v systéme voda – sediment. Testovacia metóda je čiastočne založená na existujúcich metódach (1) (2) (8) a zohľadňuje sa v nej najnovší výskum súvisiaci s posúdením rizika pre vodné rastliny (3). Metóda voda – sediment bola validovaná medzinárodným kruhovým testom vykonaným na druhoch rodu *Myriophyllum* pestovaných v statických podmienkach, ktoré boli vystavené testovanej chemikálii aplikovanej prostredníctvom vodného stĺpca (9). Testovací systém sa však ľahko prispôsobí tak, aby umožnil expozíciu prostredníctvom obohateného sedimentu alebo expozíciu prostredníctvom vodnej fázy v polostatických scenároch alebo scenároch s pulzujúcim dávkovaním, hoci tieto scenáre neboli formálne podrobené kruhovému testu. Okrem toho možno použiť všeobecnú metódu pre iné zakorenené, ponorené a emerzné druhy vrátane iných druhov rodu *Myriophyllum* (napr. *Myriophyllum aquaticum*) a druhu *Glyceria maxima* (10). V prípade alternatívnych druhov môžu byť potrebné úpravy testovacích podmienok, koncepcie a trvania testu. Predovšetkým je potrebné lepšie vymedziť vhodné postupy pre druh *Myriophyllum aquaticum*. Tieto možnosti nie sú podrobne opísané v tejto testovacej metóde, v ktorej sa opisuje štandardný prístup expozície druhu *Myriophyllum spicatum* v statickom systéme prostredníctvom vodnej fázy.

3. Táto testovacia metóda sa vzťahuje na látky, pre ktoré bola táto testovacia metóda validovaná [pozri podrobnosti v správe o kruhovom teste (9)], alebo na prípravky alebo známe zmesi. Test na druhoch rodu *Myriophyllum* možno vykonať na splnenie požiadavky na údaje stupňa 1, ktorá vyplýva z potenciálu testovanej chemikálie oddeľovať sa do sedimentu alebo zo spôsobu účinku/problémov so selektívnosťou. Laboratórny test na druhoch rodu *Myriophyllum* sa môže vyžadovať aj ako súčasť stratégie vyššieho stupňa na riešenie obáv v súvislosti s rizikom pre vodné rastliny. Od konkrétneho dôvodu na vykonanie testu bude závisieť spôsob expozície (t. j. prostredníctvom vody alebo sedimentu). Pred použitím tejto testovacej metódy na testovanie zmesi na regulačné účely by sa malo posúdiť, či môže poskytnúť primerané výsledky na tieto účely, a ak áno, je nutné to zdôvodniť. Tieto úvahy nie sú potrebné, ak existuje regulačná požiadavka na testovanie zmesi.

▼M7

PRINCÍP TESTU

4. Test je určený na vyhodnotenie účinkov chemikálií na vegetatívny rast rastlín rodu *Myriophyllum* rastúcich v štandardizovanom médiu (voda, sediment a živiny). Na tieto účely sa vrcholy výhonkov zdravých nekvitnúcich rastlín zasadia do štandardizovaného umelého sedimentu, do ktorého sa doplnia ďalšie živiny na zabezpečenie primeraného rastu rastlín, a potom sa udržiavajú v Smartovom a Barkovom médiu (dodatok 1). Po období založenia, počas ktorého sa vytvorí koreň, sa rastliny vystavia sérii testovaných koncentrácií pridaných do vodného stĺpca. Alternatívne možno simulovať expozíciu prostredníctvom sedimentu obohatením umelého sedimentu testovanou chemikáliou a presadením rastlín do tohto obohateného sedimentu. V oboch prípadoch sa rastliny následne udržiavajú v kontrolovaných podmienkach prostredia počas 14 dní. Účinky na rast sa stanovia z kvantitatívneho vyhodnotenia dĺžky, čerstvej hmotnosti a suchej hmotnosti výhonku, ako aj z kvalitatívnych pozorovaní príznakov, ako je chloróza, nekróza a deformity rastu.

5. Na kvantifikovanie účinkov súvisiacich s chemikáliou sa rast v testovacích roztokoch porovnáva s rastom v kontrolách a stanoví sa koncentrácia spôsobujúca špecifickú x % inhibíciu rastu, ktorá sa vyjadrí ako EC_x, pričom „x“ môže mať akúkoľvek hodnotu v závislosti od regulačných požiadaviek, napr. EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Treba poznamenať, že odhady hodnôt EC_{10} a EC_{20} sú spoľahlivé a vhodné len v testoch, v ktorých sú variačné koeficienty pre kontrolné rastliny nižšie ako úroveň účinku, ktorá sa odhaduje, t. j. variačné koeficienty by mali byť < 20 %, aby bolo možné spoľahlivo odhadnúť hodnotu EC_{20}.

6. Stanovuje sa priemerná špecifická rýchlosť rastu (odhadnutá z vyhodnotenia dĺžky výhonku, čerstvej hmotnosti výhonku a suchej hmotnosti výhonku) a výťažok (odhadnutý z nárastu dĺžky výhonku, čerstvej hmotnosti výhonku a zo suchej hmotnosti výhonku) pre ošetrené a neošetrené rastliny. Špecifická rýchlosť rastu (r) sa následne použije na stanovenie hodnoty E_rC_x (napr. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) a výťažok (y) na stanovenie hodnoty E_yC_x (napr. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}).

7. Ak je to potrebné, z odhadov priemernej špecifickej rýchlosti rastu a výťažku je možné štatisticky stanoviť najnižšiu koncentráciu s pozorovaným účinkom (LOEC) a koncentráciu bez pozorovaného účinku (NOEC).

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

8. Na kvantifikáciu chemikálií v testovacom médiu by mala byť k dispozícii analytická metóda s vhodnou citlivosťou.

9. Informácie o testovanej chemikálii, ktoré môžu byť užitočné pri stanovovaní podmienok testu, zahŕňajú štruktúrny vzorec, zloženie v prípade viaczložkových látok, UVCB, zmesí alebo prípravkov, čistotu, rozpustnosť vo vode, stabilitu vo vode a na svetle, disociačnú konštantu v kyseline (pK_a), rozdeľovaciu konštantu oktanol – voda (K_{ow}), hodnotu K_d pre sedimenty, ak je k dispozícii, tlak pary a biodegradovateľnosť. Rozpustnosť vo vode a tlak pary je možné použiť na výpočet Henryho konštanty, ktorá bude udávať, či je pravdepodobné, že počas testu dôjde k značným elimináciám testovanej chemikálie. Ak je pravdepodobné, že dôjde elimináciám testovaných chemikálií, je nutné ich kvantifikovať a zdokumentovať následné kroky na ich kontrolu. Ak sú informácie o rozpustnosti a stabilite testovanej chemikálie (chemikálií) neurčité, odporúča sa, aby sa tieto vlastnosti vyhodnotili za podmienok testu, t. j. s rastovým médiom, teplotou a režimom osvetlenia použitými v teste. *Poznámka:* Ak sa testujú peroxidujúce herbicídy závislé od svetla, použité laboratórne osvetlenie by malo obsahovať svetlo rovnocenné slnečnému ultrafialovému svetlu zo slnečného žiarenia.

▼M7

10. V testovacom médiu by sa mala odmerať a podľa potreby upraviť hodnota pH. Kontrola pH testovacieho média je mimoriadne dôležitá napríklad pri testovaní kovov alebo chemikálií, ktoré sú hydrolyticky nestabilné. Ďalšie informácie o testovaných chemikáliách a ich fyzikálno-chemických vlastnostiach, ktoré sťažujú ich testovanie, sú uvedené v usmerňovacom dokumente OECD (11).

PLATNOSŤ TESTU

11. Na to, aby výsledky testu boli platné, sa priemerná celková dĺžka výhonku a priemerná celková čerstvá hmotnosť výhonku kontrolných rastlín musia počas vychytávacej fázy testu aspoň zdvojnásobiť. Kontrolné rastliny navyše nesmú prejavovať žiadne viditeľné príznaky chlorózy a mali by byť viditeľne bez kontaminácie inými organizmami, ako sú riasy a/alebo bakteriálny povlak na rastlinách, na povrchu sedimentu a v testovacom médiu.

12. Priemerný variačný koeficient pre výťažok na základe meraní čerstvej hmotnosti výhonku (teda od začatia testu po skončenie testu) v kontrolných kultúrach nepresahuje 35 % medzi replikátmi.

REFERENČNÁ CHEMIKÁLIA

13. Na overenie spoľahlivosti testovacieho postupu v čase možno otestovať referenčnú chemikáliu (chemikálie), napríklad 3,5-dichlórfenol použitý v kruhovom teste (9). Údaje z kruhového testu naznačujú, že priemerné hodnoty EC50 rôznych závisle premenných pre 3,5-DCP boli medzi 4,7 a 6,1 mg/l (podrobnosti o očakávanom intervale spoľahlivosti okolo týchto hodnôt nájdete v správe o kruhovom teste). Odporúča sa testovať referenčnú chemikáliu najmenej dvakrát do roka alebo, ak sa testovanie vykonáva zriedkavo, súbežne s konečnými testami toxicity. Usmernenie o očakávaných hodnotách EC50 pre 3,5-DCP sa nachádza v štatistickej správe o medzinárodnom kruhovom teste (9).

OPIS METÓDY

Testovacie vybavenie

14. Test sa má vykonať v kontrolovaných podmienkach prostredia, t. j. v rastovej komore, rastovej miestnosti alebo laboratóriu, s regulovanou dĺžkou dňa, osvetlením a teplotou (pozri oddiel „Podmienky testu“, body 56 – 58). Zásobné kultúry by sa mali udržiavať oddelene od testovacích nádob.

15. Štúdia by sa mala vykonať s použitím sklenených testovacích nádob, ako sú akváriá alebo kadičky. Zvyčajne sa používajú 2 l sklenené kadičky (s výškou približne 24 cm a priemerom 11 cm). Vhodné však môžu byť aj iné (t. j. väčšie) nádoby za predpokladu, že umožnia dostatočnú hĺbku vody na neobmedzený rast a ponorenie rastlín počas celého trvania testu.

16. Ako nádoby na zasadenie rastlín do sedimentu možno použiť plastové alebo sklenené kvetináče (priemer približne 9 cm, výška 8 cm a objem 500 ml). Alternatívne možno použiť sklenené kadičky, ktoré sa v niektorých prípadoch uprednostňujú (napr. na testovanie hydrofóbnych chemikálií alebo chemikálií s vysokou hodnotou K_{ow}).

17. Výber veľkosti kvetináča/kadičky treba zvažovať spolu s výberom testovacích nádob a uprednostňovanej koncepcie testu (pozri ďalej). Ak sa používa koncepcia testu A (jeden výhonok na kvetináč a tri kvetináče na nádobu), môžu byť potrebné menšie kvetináče alebo väčšie nádoby. Ak sa používa koncepcia testu B (tri výhonky na kvetináč a jeden kvetináč na nádobu), mali by byť vhodné uvedené veľkosti kvetináčov a nádob. Vo všetkých prípadoch by mala byť minimálna hĺbka nadložnej vody 12 cm nad povrchom sedimentu a mal by sa zaznamenať pomer plochy povrchu/objemu sedimentu k ploche povrchu/objemu vody.

▼M7

Testovací organizmus

18. Všeobecné prístupy opísané v tejto testovacej metóde sa môžu použiť na testovanie rôznych druhov vodných rastlín. Podmienky uvedené v tejto testovacej metóde však boli prispôsobené na testovanie druhu stolístka *Myriophyllum spicatum*. Tento druh patrí do čeľade dvojklíčnolistových rastlín *Haloragaceae* (zrnulkovité).

19. *Myriophyllum spicatum* (stolístok klasnatý) je ponorený zakorenený druh, ktoré znáša celý rad podmienok a vyskytuje sa v stojatých i tečúcich vodách. *M. spicatum* je viacročná rastlina, ktorá počas zimy prežíva len ako koreň. Rastliny zvyčajne kvitnú a voľne šíria semená, hoci často je hlavnou metódou kolonizácie vegetatívne rozmnožovanie prostredníctvom pazušných pupeňov alebo úlomkov stonky, ktoré sa oddeľujú prirodzene alebo po narušení.

Kultivácia testovacieho organizmu

20. Rastliny možno získať z prirodzených populácií alebo od dodávateľov vodných rastlín. V oboch prípadoch by sa zdroj rastlín mal zdokumentovať a mala by sa overiť totožnosť druhu. Treba dávať veľký pozor na to, aby sa pri zbere *Myriophyllum spicatum* v teréne získal správny druh, a to najmä v regiónoch, kde sa môže kríženť s inými druhmi rodu *Myriophyllum*. V prípade pochybností sa odporúča použiť overené laboratórne kultúry zo známych zdrojov. V teste by sa nemali použiť rastliny, ktoré boli vystavené akýmkoľvek chemickým kontaminantom alebo nazbierané na lokalitách so známou kontamináciou.

21. V regiónoch, kde druh *M. spicatum* nie je ľahko dostupný počas zimných mesiacov, môže byť potrebné dlhodobé udržiavanie zásobných kultúr v skleníku alebo v laboratórnych podmienkach. Zásobné kultúry by mali udržiavať za podobných podmienok, ako sú podmienky testu, možno však znížiť intenzitu ožiarenia a teplotu, aby sa znížila frekvencia údržby kultúry (napr. v čase, keď sa neplánujú žiadne testy s rodom *Myriophyllum*). Odporúča sa použiť väčšie akvária a kvetináče, ako by sa použili v testoch, aby rastliny mali dosť miesta na rozrastanie. Zloženie sedimentových a vodných médií by malo byť rovnaké, ako by sa použilo v testoch, možno však použiť aj alternatívne metódy hnojenia sedimentu (napr. komerčné hnojivá s pomalým uvoľňovaním).

22. Zásobné rastliny by mali byť viditeľne bez kontaminácie inými organizmami vrátane slimákov, vláknitých rias, plesní a hmyzu, napr. vajíčok alebo lariev mole *Paraponyx stratiotata* a lariev alebo dospelých jedincov druhu *Eubrychius velutus* z čeľade nosáčikovité. Na odstránenie viditeľnej kontaminácie môže byť potrebné prepláchnuť rastlinný materiál v čerstvej vode. Okrem toho sa treba pokúsiť minimalizovať rozvoj jednobunkových rias a bakteriálnej kontaminácie, hoci úplná sterilnosť rastlinného materiálu nie je nutná. Zásobné kultúry by sa mali monitorovať a podľa potreby presadiť, aby nedošlo k rozvoju riasovej a bakteriálnej kontaminácie. Ak sa vyskytne problém riasovej alebo bakteriálnej kontaminácie, môže pomôcť prevzdušňovanie zásobných kultúr.

23. Vo všetkých prípadoch sa rastliny pred použitím v teste dostatočne dlho (> 2 týždne) kultivujú/aklimatizujú za podmienok, ktoré sú podobné, ale nie nevyhnutne rovnaké ako pri teste.

24. Kvitnúce zásobné kultúry sa v teste nemajú používať, lebo počas kvitnutia a po ňom vo všeobecnosti klesá rýchlosť vegetatívneho rastu.

▼M7

Sediment

25. V tomto teste sa odporúča použiť nasledujúci pripravený sediment založený na umelom sedimente použitom v testovacej metóde C.28 tejto prílohy (8). Sediment sa pripravuje podľa metódy TM C.28 s výnimkou pridania živín, ako sa uvádza ďalej:

a) 4 – 5 % rašeliny (suchá hmotnosť, 2 ± 0,5 % organického uhlíka) s pH čo najbližšie k 5,5 až 6,0, pričom dôležité je použiť rašelinu v práškovej forme, jemne rozdrvenú (veľkosť častíc podľa možnosti < 1 mm) a sušenú len na vzduchu;

b) 20 % (suchá hmotnosť) kaolínu (obsah kaolinitu podľa možnosti nad 30 %);

c) 75 – 76 % (suchá hmotnosť) kremenného piesku (mal by prevládať jemný piesok s viac ako 50 % častíc s veľkosťou od 50 do 200 μm);

d) pridá sa také množstvo vodného živného média, aby konečná vzorka sedimentu obsahovala po 200 mg/kg suchého sedimentu chloridu amónneho i fosforečnanu sodného a aby obsah vlhkosti konečnej zmesi bol v rozsahu 30 – 50 %;

e) pridá sa uhličitan vápenatý chemicky čistej kvality ($CaCO_3$), aby sa pH konečnej zmesi sedimentu upravilo na 7,0 ± 0,5.

26. Zdroj rašeliny, kaolínu a piesku by mal byť známy a zdokumentovaný. Ak je pôvod neznámy alebo vyvoláva určité obavy, je potrebné skontrolovať, či sú príslušné zložky bez chemickej kontaminácie (napr. ťažkými kovmi, organochlórovými zlúčeninami, organofosforovými zlúčeninami).

27. Suché zložky sedimentu by sa mali homogénne zmiešať a následne sa do sedimentu dôkladne primieša vodný živný roztok. Vlhký sediment je potrebné pripraviť aspoň dva dni pred použitím, aby sa dôkladne zvlhčila rašelina a aby sa zabránilo vyplávaniu hydrofóbnych častíc rašeliny na povrch, keď sa sediment prekryje médiom. Vlhký sediment možno pred použitím skladovať v tme.

28. Na účely testu sa sediment prenesie do nádob vhodnej veľkosti, napríklad do kvetináčov s takým priemerom, aby sa zmestili do sklenených nádob (povrch sedimentu by mal pokrývať približne 70 % alebo viac povrchu nádoby). Ak má nádoba na dne otvory, na udržanie sedimentu vnútri nádoby možno na dno nádoby umiestniť kúsok filtračného papiera. Kvetináče sa naplnia sedimentom tak, aby bol povrch sedimentu rovný. Ten sa potom pokryje tenkou vrstvou (~ 2 až 3 mm) inertného materiálu, napríklad piesku alebo jemnej záhradníckej drviny (alebo rozdrvených koralov), aby sa sediment udržal na mieste.

Testovacie médium

29. Na kultiváciu a testovanie druhu *Myriophyllum spicatum* sa odporúča použiť Smartovo a Barkovo médium (12). Príprava tohto média je opísaná v dodatku 1. Hodnota pH média (vodnej fázy) by na začiatku testu mala byť medzi 7,5 a 8,0, aby sa dosiahol optimálny rast rastlín.

Návrh experimentu

30. Test by mal zahŕňať minimálne šesť replikačných testovacích nádob pre kontroly bez ovplyvňovania chemikáliou a minimálne štyri replikačné testovacie nádoby pre každú z minimálne piatich úrovní koncentrácie.

31. Ak sa nevyžaduje stanovenie hodnoty NOEC, koncepcia testu sa môže upraviť tak, že sa zvýši počet koncentrácií a zníži počet replikátov na koncentráciu.

▼M7

32. Každá testovacia nádoba predstavuje replikát obsahujúci tri výhonky. Existujú dve možnosti pestovania troch výhonkov v každej testovacej nádobe:

— koncepcia testu A: jeden výhonok na kvetináč a tri kvetináče na nádobu,

— koncepcia testu B: tri výhonky na kvetináč a jeden kvetináč na nádobu,

— alternatívne koncepcie testu s jedným výhonkom na kvetináč na testovaciu nádobu sú prijateľné za predpokladu, že replikácia sa upraví podľa potreby tak, aby sa dosiahli požadované validačné kritériá.

33. Jednotlivé testovacie nádoby by sa mali náhodne priradiť ovplyvňovaným skupinám. Testovacie nádoby sa musia v oblasti testu rozmiestniť náhodne, aby sa minimalizoval vplyv priestorových rozdielov v intenzite svetla alebo teplote.

Koncentrácie testovanej chemikálie a kontrolné skupiny

34. Koncentrácie by za normálnych okolností mali byť usporiadané v geometrickom rade. Rozdeľovací koeficient medzi testovanými koncentráciami by nemal byť vyšší ako 3,2. Pri voľbe vhodných testovaných koncentrácií pomôžu predchádzajúce poznatky o toxicite testovanej chemikálie z testov na vyhľadávanie rozsahu.

35. Na stanovenie hodnoty EC_x by testované koncentrácie mali obklopovať hodnotu EC_x, aby sa zabezpečila primeraná úroveň spoľahlivosti. Ak sa napríklad odhaduje hodnota EC_{50}, najvyššia testovaná koncentrácia by mala byť vyššia ako hodnota EC_{50}. Ak je hodnota EC_{50} mimo rozsahu testovaných koncentrácií, príslušné intervaly spoľahlivosti budú veľké a môže sa stať, že nebude možné správne posúdiť vhodnosť modelu na štatistické spracovanie. Použitím viacerých testovaných koncentrácií sa zlepší interval spoľahlivosti okolo výslednej hodnoty EC_x.

36. Na stanovenie hodnôt LOEC/NOEC (voliteľné sledované parametre) by najnižšia testovaná koncentrácia mala byť dostatočne nízka na to, aby sa rast významne nelíšil od rastu kontrolných rastlín. Najvyššia testovaná koncentrácia okrem toho by mala byť dostatočne vysoká na to, aby bol rast významne nižší než v kontrole. Štatistická spoľahlivosť koncepcie s použitím koncentrácie bez účinku/testu ANOVA sa posilní použitím väčšieho počtu replikátov.

Limitný test

37. V prípadoch, keď z testu na vyhľadávanie rozsahu vyplýva, že testovaná chemikália nemá nepriaznivé účinky pri koncentráciách do 100 mg/l alebo do svojho limitu rozpustnosti v testovacom médiu, alebo v prípade prípravku do limitu dispergovateľnosti, sa môže vykonať limitný test umožňujúci porovnanie reakcií v kontrolnej skupine a v jednej ovplyvňovanej skupine – 100 mg/l alebo koncentrácia rovná limitu rozpustnosti, alebo 1 000 mg/kg suchého sedimentu. Tento test by sa mal riadiť všeobecnými zásadami štandardného testu reakcie na dávku s výnimkou toho, že sa odporúča zvýšiť minimálny počet replikátov na šesť testovacích nádob pre každú kontrolu a koncentráciu. Rast v kontrolnej a ovplyvňovanej skupine sa môže analyzovať s použitím štatistického testu na porovnanie priemerov, napr. Studentovho t-testu.

Testovacie roztoky

38. Testovacie roztoky sa zvyčajne pripravujú zriedením zásobného roztoku, ktorý sa pripraví rozpustením alebo disperziou testovanej chemikálie v Smartovom a Barkovom médiu s použitím demineralizovanej (teda destilovanej alebo deionizovanej) vody (pozri dodatok 1).

▼M7

39. Najvyššia testovaná koncentrácia by za normálnych okolností nemala prekročiť rozpustnosť testovanej chemikálie vo vode alebo v prípade prípravkov dispergovateľnosť za podmienok testu.

40. Pre testované chemikálie s nízkou rozpustnosťou vo vode môže byť potrebné pripraviť koncentrovaný zásobný roztok alebo disperziu chemikálie s použitím organického rozpúšťadla alebo dispergantu, aby sa umožnilo pridanie presných množstiev testovanej chemikálie do testovacieho média a napomohlo sa jej rozptýlenie a rozpustenie. Použitiu takýchto rozpúšťadiel alebo dispergantov sa treba v maximálnej možnej miere vyhýbať. Použitie pomocných rozpúšťadiel alebo dispergantov by nemalo viesť k žiadnej fytotoxicite. Medzi bežne používané rozpúšťadlá, ktoré nespôsobujú fytotoxicitu pri koncentráciách do 100 µl/l, patrí napríklad acetón a dimetylformamid. Ak sa používa rozpúšťadlo alebo dispergant, jeho konečná koncentrácia by sa mala zaznamenať a udržiavať na minime (≤ 100 µl/l). Za týchto okolností by všetky ovplyvňované skupiny a kontroly (s aplikáciou rozpúšťadla) mali obsahovať rovnakú koncentráciu rozpúšťadla alebo dispergantu. Súčasťou testu sú aj neošetrené kontrolné replikáty, ktoré neobsahujú rozpúšťadlo ani dispergant. Ďalšie informácie o použití dispergantov sú uvedené v usmerňovacom dokumente OECD (11).

TESTOVACÍ POSTUP

41. Testovací postup sa líši podľa spôsobu aplikácie testovanej chemikálie (t. j. prostredníctvom vodnej alebo sedimentovej fázy). Pri výbere režimu expozície použitého v teste (teda statického alebo statického obnovovacieho systému, obohatenej vody alebo obohateného sedimentu) by sa malo zvážiť pravdepodobné správanie testovanej chemikálie v systéme voda – sediment. Testy s obohateným sedimentom sa v niektorých prípadoch môžu uprednostniť pre chemikálie, ktoré sa pravdepodobne výrazne rozdeľujú do sedimentu.

Fáza založenia

42. Zdravé vrcholy/špičky výhonkov, teda bez vedľajších výhonkov, sa narežú z kultivačných rastlín na dĺžku výhonku 6 cm (± 1 cm). V prípade koncepcie testu A (jeden výhonok na kvetináč a tri kvetináče na nádobu) sa do každého kvetináča zasadí vrchol z jedného výhonku. V prípade koncepcie testu B (tri výhonky na kvetináč a jeden kvetináč na nádobu) sa do každého kvetináča obsahujúceho sediment zasadí štyri až päť vrcholov výhonkov.

43. V oboch prípadoch sa mali výhonky zasadiť do nadbytočných kvetináčov, aby bolo na začiatku testu možné vybrať uniformné rastliny a aby sa získali náhradné rastliny, ktoré sa použijú na kontrolu rastu koreňa bezprostredne pred ošetrením a na účely merania biomasy a dĺžky výhonku v 0. deň.

44. Výhonky sa vkladajú tak, aby približne tri centimetre zahŕňajúce aspoň dve kolienka boli pod povrchom sedimentu.

45. Kvetináče sa potom prenesú do testovacích nádob s rovnakými podmienkami prostredia ako vo vychytávacej fáze a udržiavajú sa sedem dní v Smartovom a Barkovom médiu, aby sa vyvolal vývin koreňa.

46. Po uplynutí tohto obdobia sa má niekoľko rastlín v náhradných kvetináčoch vybrať na účely kontroly rastu koreňa. Ak rast koreňa nie je viditeľný (t. j. nie sú viditeľné špičky koreňa), fáza založenia by sa mala predĺžiť, kým nebude rast koreňa viditeľný. Tento krok sa odporúča, aby sa zabezpečil aktívny rast rastlín v čase začatia testu.

▼M7

Výber uniformného rastlinného materiálu

47. V prípade koncepcie testu A (jeden výhonok na kvetináč a tri kvetináče na nádobu) sa pred začiatkom testu vyberú uniformné kvetináče. V prípade koncepcie testu B (tri výhonky na kvetináč a jeden kvetináč na nádobu) sa odstránia nadbytočné rastliny, aby zostali tri rastliny s uniformnou veľkosťou a vzhľadom.

Expozícia prostredníctvom vodnej fázy

48. Vybrané uniformné kvetináče sa umiestnia do testovacích nádob v súlade s návrhom experimentu. Do testovacích nádob sa potom pridá Smartovo a Barkovo médium. Treba dbať na to, aby sa nenarušil sediment. Na tieto účely sa médium môže pridávať pomocou lievika alebo plastového kotúča, ktorým sa zakryje sediment pri nalievaní média do testovacích nádob, pričom kotúč sa ihneď potom musí odstrániť. Alternatívne sa kvetináče môžu umiestniť do testovacích nádob až po pridaní média. V oboch prípadoch možno na začiatku vychytávacej fázy použiť čerstvé médiá, ak je to potrebné na minimalizáciu potenciálneho hromadenia rias a baktérií alebo na účely prípravy jednotných vzoriek testovacieho roztoku pre všetky replikáty.

49. Pred pridaním média alebo po ňom sa odmeria dĺžka výhonku nad sedimentom.

50. Príslušné množstvá testovanej chemikálie možno pridať do testovacieho média predtým, ako sa pridá do testovacích nádob. Alternatívne sa testovaná chemikália môže pridať do média až po jeho pridaní do testovacích nádob. V takom prípade treba dbať na to, aby sa testovaná látka homogénne distribuovala v celom testovacom systéme bez toho, aby sa narušil sediment.

51. Vo všetkých prípadoch sa na začiatku testu zaznamená vzhľad testovacieho média (napr. číry, zakalený atď.).

Expozícia prostredníctvom sedimentu

52. Obohatené sedimenty vybranej koncentrácie sa pripravujú pridaním roztoku testovanej chemikálie priamo do čerstvého sedimentu. Zásobný roztok testovanej chemikálie rozpustenej v deionizovanej vode sa zmieša s pripraveným sedimentom pomocou valcového mlyna, stroja na miešanie krmív alebo ručným miešaním. Ak je testovaná chemikália slabo rozpustná vo vode, možno ju rozpustiť v čo najmenšom objeme vhodného organického rozpúšťadla (napr. hexánu, acetónu alebo chloroformu). Tento roztok sa následne zmieša s približne 10 g jemného kremenného piesku na jednu testovaciu nádobu. Rozpúšťadlo sa nechá odpariť a piesok sa potom zmieša s vhodným množstvom sedimentu na danú testovaciu kadičku. Na rozpustenie, disperziu alebo emulgovanie testovanej chemikálie možno použiť iba látky, ktoré sú ľahko prchavé. Treba mať na zreteli, že pri konečnej príprave sedimentu je nutné zohľadniť objem/hmotnosť piesku obohateného testovanou chemikáliou (sediment sa teda musí pripraviť s menším množstvom piesku). Treba zabezpečiť, aby sa testovaná chemikália pridávaná do sedimentu v sedimente dôkladne a rovnomerne distribuovala.

53. Obohatený sediment sa naplní do kvetináčov (ako je opísané vyššie). Vybrané uniformné rastliny s dostatočným koreňovým systémom sa vyberú z kvetináčov použitých počas fázy založenia a presadia sa do obohateného sedimentu, ako je opísané vyššie.

54. Kvetináče sa umiestnia do testovacích nádob v súlade s návrhom experimentu. Potom sa opatrne pridá Smartovo a Barkovo médium (pomocou lievika) tak, aby sa nenarušil sediment. Odmeria sa dĺžka výhonku nad sedimentom, a to pred pridaním média alebo po ňom.

▼M7

Udržiavanie výšky hladiny vody počas trvania testu

55. Musí sa zaznamenať konečný objem vody a na každú testovaciu nádobu sa musí vyznačiť výška hladiny vody. Ak sa počas testu odparí viac ako 10 % vody, výška hladiny vody by sa mala upraviť destilovanou vodou. V prípade potreby možno kadičky voľne zakryť priehľadnými krytmi, napríklad priehľadnými plastovými viečkami, aby sa minimalizovalo odparovanie a kontaminácia spórami rias.

Podmienky testu

56. Na zabezpečenie intenzity ožiarenia v rozsahu približne 140 (± 20) $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$ sa používa teplé a/alebo studené biele fluorescenčné svetlo, ktoré sa meria ako fotosynteticky aktívne žiarenie (400 – 700 nm) na povrchu vody a s použitím pomeru svetlo:tma 16:8 hod. Prípadné odchýlky od zvolenej intenzity ožiarenia oblasti testu by nemali presiahnuť rozmedzie ± 15 %.

57. Teplota v testovacích nádobách je 20 ± 2 °C.

58. Hodnota pH kontrolného média by sa počas testu nemala zvýšiť o viac ako 1,5 jednotky. Odchýlka o viac ako 1,5 jednotky by však nespôsobila neplatnosť testu, ak možno preukázať, že sú splnené vopred stanovené validačné kritériá.

Trvanie testu

59. Obdobie expozície trvá 14 dní.

Merania a analytické stanovenia

60. Po fáze založenia a bezprostredne pred ošetrením (teda v 0. deň) sa vyberú náhradné rastliny z piatich náhodne vybraných kvetináčov v prípade koncepcie s troma rastlinami na kvetináč alebo 15 kvetináčov v prípade koncepcie s jednou rastlinou na kvetináč na účely vyhodnotenia dĺžky a čerstvej a suchej hmotnosti výhonkov, ako je opísané ďalej.

61. Vykonajú sa tieto hodnotenia rastlín prenesených do vychytávacej fázy (tabuľka 1):

— hodnotenia dĺžky hlavného výhonku, počtu bočných výhonkov a dĺžky bočných výhonkov sa zaznamenajú aspoň na konci obdobia expozície (napr. v 14. deň),

— vizuálne hodnotenia zdravia rastlín sa zaznamenajú aspoň trikrát počas obdobia expozície (napr. v 0., 7. a 14. deň),

— hodnotenia čerstvej a suchej hmotnosti výhonku sa vykonajú na konci testu (t. j. v 14. deň).

62. Dĺžka výhonku sa stanoví pomocou pravítka. Ak sú prítomné bočné výhonky, odmeria sa aj ich počet a dĺžka.

63. Vizuálne hodnotenie zdravia rastlín sa vykoná tak, že sa zaznamená vzhľad rastlín a celkový stav testovacieho média. Majú sa zaznamenať tieto pozorovania:

— nekróza, chloróza alebo iná zmena farby, napríklad nadmerné sčervenanie oproti kontrolným rastlinám,

— rozvoj bakteriálnej alebo riasovej kontaminácie,

— abnormality rastu, napríklad zakrpatenie, zmena dĺžky medzi kolienkami, deformované výhonky/listy, rozrastanie bočných výhonkov, strata listov, strata turgoru a fragmentácia stonky,

▼M7

— pri skončení testu sa vykoná vizuálne hodnotenie zdravia koreňa: z koreňov sa dôkladne omyje sediment, aby bolo možné pozorovať koreňový systém. Navrhovaný rozsah hodnotenia v porovnaní s kontrolnými rastlinami:

1. neprítomné korene;

2. málo koreňov;

3. stredný vývin koreňa;

4. veľmi dobrý vývin koreňa, podobný ako v kontrolách.

64. Na začiatku a na konci testu sa vykoná hodnotenie čerstvej hmotnosti tak, že výhonok sa odreže na úrovni sedimentu a pred vážením sa otrie do sucha. Treba dbať na to, aby sa odstránili častice sedimentu, ktoré môžu priľnúť k spodku výhonku. Výhonky sa potom umiestnia do sušiacej pece pri teplote približne 60 °C a vysušia sa na konštantnú hmotnosť, potom sa znova odvážia a zaznamená sa suchá hmotnosť.

65. Tabuľka 1 obsahuje zhrnutie minimálnych biologických hodnotení vyžadovaných počas trvania testu.

Tabuľka 1

Harmonogram hodnotení

Deň po ovplyvnení (DAT)	*Myriophyllum spicatum*			
	Dĺžka výhonku, dĺžka a počet bočných výhonkov	Vizuálne hodnotenie výhonkov	Čerstvá a suchá hmotnosť výhonkov, vizuálne hodnotenie výhonkov	pH O_2
0	A	A	A	A
4	—	—	—	—
7	—	A	—	A
14	A	A	A	A

A: znamená, že pri týchto príležitostiach sú hodnotenia povinné.
—: znamená, že merania nie sú povinné.

Frekvencia meraní a analytických stanovení

66. Teplota média v doplnkovej nádobe udržiavanej v rovnakých podmienkach v rastovej komore, inkubátore alebo miestnosti by sa mala zaznamenať minimálne raz za deň (alebo priebežne pomocou zapisovača údajov).

67. Hodnota pH a koncentrácia rozpusteného kyslíka v testovacom médiu treba skontrolovať na začiatku testu, aspoň raz počas testu a na konci testu vo všetkých replikačných nádobách. Merania by sa pri každej príležitosti mali vykonávať v rovnakom čase počas dňa. Ak sa na prípravu všetkých replikátov pre každú testovanú koncentráciu používajú spoločné roztoky, potom je prijateľné jedno meranie každého spoločného roztoku v 0. deň.

68. Intenzita ožiarenia by sa mala merať v rastovej komore, inkubátore alebo miestnosti v bodoch zodpovedajúcich výške hladiny vody. Merania by sa mali uskutočniť minimálne raz na začiatku alebo počas testu. Metóda detekcie a merania svetla, najmä typ senzora, ovplyvní meranú hodnotu.

▼M7

Guľové senzory (ktoré reagujú na svetlo zo všetkých uhlov nad a pod rovinou merania) a „kosínusové“ senzory (ktoré reagujú na svetlo zo všetkých uhlov nad rovinou merania) sa uprednostňujú pred jednosmernými senzormi a poskytnú vyššie hodnoty v prípade viacbodového zdroja svetla takého typu, aký sa uvádza v tejto metóde.

Analytické merania testovanej chemikálie

69. Na zabezpečenie správnej aplikácie testovanej chemikálie je nutné vykonať analytické merania koncentrácie testovanej chemikálie.

70. Pre všetky testované koncentrácie je bezprostredne po začatí testu (t. j. v deň aplikácie v prípade stabilných testovaných chemikálií alebo jednu hodinu po aplikácii v prípade nestabilných chemikálií) a pri skončení testu potrebné odobrať vzorky vody na analýzu testovanej chemikálie.

71. Na začiatku a na konci testu je potrebné stanoviť koncentrácie v sedimente a v pórovej vode sedimentu aspoň pri najvyššej testovanej koncentrácii, pokiaľ nie je známe, že testované chemikálie sú stabilné vo vode (> 80 % nominálnej hodnoty). Merania v sedimente a pórovej vode nemusia byť potrebné, ak sa rozdeľovanie testovanej chemikálie medzi vodu a sediment jednoznačne určilo v štúdii voda/sediment pri porovnateľných podmienkach (napr. pomer sedimentu k vode, metóda aplikácie, druh sedimentu).

72. Odobratím sedimentu na začiatku testu by sa pravdepodobne narušil testovací systém. Preto môžu byť na uľahčenie analytických stanovení na začiatku a na konci testu potrebné ďalšie testovacie nádoby s ovplyvnenými vzorkami. Podobne, ak sa považujú za nevyhnutné priebežné hodnotenia (na 7. deň) a analýzy si vyžadujú veľké vzorky sedimentu, ktoré sa nedajú ľahko odobrať z testovacieho systému, analytické stanovenia by sa mali robiť s použitím ďalších testovacích nádob so vzorkami ošetrenými rovnakým spôsobom ako vzorky použité na biologické hodnotenia.

73. Na izolovanie intersticiálnej vody sa odporúča centrifugácia s nastavením napríklad 10 000 g a pri teplote 4 °C počas 30 minút. Ak sa však preukáže, že testovaná chemikália sa neabsorbuje na filtroch, môže byť prijateľná aj filtrácia. V niektorých prípadoch nemusí byť možné analyzovať koncentrácie v pórovej vode, ak je vzorka príliš malá.

74. V poloatatických testoch (t. j. expozícia prostredníctvom vodnej fázy), v ktorých sa očakáva, že koncentrácia príslušnej testovanej chemikálie (chemikálií) nezostane počas trvania testu v rozmedzí 20 % od nominálnej koncentrácie bez obnovenia testovacích roztokov, by sa pri každom obnovení mali odobrať použité a čerstvo pripravené testovacie roztoky na analýzy koncentrácie testovanej chemikálie.

75. V prípadoch, keď nameraná počiatočná koncentrácia testovanej chemikálie nie je v rozmedzí 20 % od nominálnej hodnoty, ale keď existujú postačujúce dôkazy na preukázanie, že počiatočné koncentrácie sú opakovateľné a stabilné (t. j. v rozsahu 80 – 120 % počiatočnej koncentrácie), sa stanovenia chemikálie môžu vykonať iba s najvyššími a najnižšími testovanými koncentráciami.

76. Vo všetkých prípadoch sa stanovenie koncentrácie testovanej chemikálie musí vykonať iba v jednej replikačnej nádobe pri každej testovanej koncentrácii. Alternatívne sa testovacie roztoky všetkých replikátov pre každú koncentráciu môžu na účely analýzy zlúčiť.

77. Ak je dokázané, že koncentrácia testovanej chemikálie sa počas testu udržiavala v rozmedzí 20 % od nominálnej alebo nameranej počiatočnej koncentrácie, analýza výsledkov a následné odvodenie sledovaných parametrov sa môžu zakladať na nominálnych alebo nameraných počiatočných hodnotách.

▼M7

78. V týchto prípadoch by účinné koncentrácie mali vychádzať z nominálnej alebo nameranej koncentrácie vo vode na začiatku testu.

79. Ak sa však dokáže, že koncentrácia počas testu klesla (t. j. nie je udržiavaná v rozmedzí 20 % od nominálnej alebo nameranej pôvodnej koncentrácie v ošetrenej vzorke), analýza výsledkov by mala byť založená na geometrickom priemere koncentrácií počas expozície alebo na modeloch opisujúcich pokles koncentrácie testovanej chemikálie v ošetrenej vzorke (11).

HODNOTENIE ÚDAJOV

80. V prípadoch, keď sa vyžaduje použitie rozpúšťadla/dispergantu, možno údaje o kontrolách s aplikáciou rozpúšťadla a neošetrených kontrolách spojiť na účely štatistických analýz za predpokladu, že reakcie v kontrolách s aplikáciou rozpúšťadla a kontrolách bez ovplyvnenia chemikáliou sa štatisticky významne nelíšia.

Závisle premenné

81. Účelom tohto testu je stanoviť účinky testovanej chemikálie na vegetatívny rast testovacieho druhu s použitím dvoch závisle premenných: priemernej špecifickej rýchlosti rastu a výťažku, a to takto:

Priemerná špecifická rýchlosť rastu

82. Táto závisle premenná je založená na zmenách logaritmov celkovej dĺžky výhonku, celkovej čerstvej hmotnosti výhonku a celkovej suchej hmotnosti výhonku v čase v kontrolách a v každej ovplyvňovanej skupine. Táto premenná sa vypočítava pre každý replikát každej kontrolnej a ovplyvňovanej skupiny. Priemerná dĺžka a hmotnosť troch rastlín na testovaciu nádobu (replikát) a následne aj miera rastu pre každý replikát sa vypočítajú pomocou tohto vzorca:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

kde:

μ_{i-j}: priemerná špecifická rýchlosť rastu od času i do času j,

N_i: meraná premenná v testovacej alebo kontrolnej nádobe v čase i,

N_j: meraná premenná v testovacej alebo kontrolnej nádobe v čase j,

t: časové obdobie medzi i a j.

83. Z reakcií replikátov sa vypočíta priemerná hodnota pre rýchlosť rastu spolu s odhadmi rozptylu pre každú ovplyvňovanú a kontrolnú skupinu.

84. Priemerná špecifická rýchlosť rastu by sa mala vypočítať pre celé obdobie testu (čas „i“ v uvedenom vzorci je začiatok testu a čas „j“ je koniec testu). Pre každú testovanú koncentráciu a kontrolnú vzorku sa vypočíta priemerná hodnota priemernej špecifickej rýchlosti rastu spolu s odhadmi rozptylu.

▼M7

85. Pre každú testovanú koncentráciu (ovplyvňovanú skupinu) sa potom môže vypočítať percentuálna inhibícia rýchlosti rastu (I_r) podľa tohto vzorca:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

kde:

% I_r: percentuálna inhibícia priemernej špecifickej rýchlosti rastu,

μ_C: priemerná hodnota pre μ v kontrole,

μ_T: priemerná hodnota pre μ v ovplyvňovanej skupine.

Výťažok

86. Táto závisle premenná je založená na zmenách celkovej dĺžky výhonku, celkovej čerstvej hmotnosti výhonku a celkovej suchej hmotnosti výhonku v čase v kontrolách a v každej ovplyvňovanej skupine. Pre každú ovplyvňovanú skupinu sa môže vypočítať priemerná percentuálna inhibícia výťažku (% Iy) takto:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

kde:

% I_y: percento zníženia výťažku,

b_C: rozdiel konečného množstva biomasy a počiatočného množstva biomasy pre kontrolnú skupinu,

b_T: rozdiel konečného množstva biomasy a počiatočného množstva biomasy v ovplyvňovanej skupine.

Zakreslenie kriviek závislosti veličiny od koncentrácie

87. Je potrebné zostrojiť krivky závislosti veličiny od koncentrácie pre vzťah medzi priemernou percentuálnou inhibíciou závisle premennej (I_r alebo I_y) vypočítanou podľa postupu uvedeného vyššie a logaritmom koncentrácie testovanej chemikálie.

Odhad hodnoty EC_x

88. Odhady hodnoty EC_x (napr. EC_{50}) by sa mali zakladať na hodnotách priemernej špecifickej rýchlosti rastu (E_rC_x) a výťažku (E_yC_x), z ktorých každá by sa mala zakladať na celkovej čerstvej hmotnosti výhonku, celkovej suchej hmotnosti výhonku a celkovej dĺžke výhonku).

89. Treba si uvedomiť, že hodnoty EC_x vypočítané s použitím týchto dvoch závisle premenných nie sú porovnateľné a tento rozdiel treba zohľadniť pri použití výsledkov testu. Hodnoty EC_x založené na priemernej špecifickej rýchlosti rastu (E_rC_x) budú vo väčšine prípadov vyššie ako výsledky založené na výťažku (E_yC_x) – ak boli dodržané podmienky tejto testovacej metódy – vzhľadom na matematický základ príslušných metód. Tento rozdiel by sa nemal vysvetľovať ako rozdiel v citlivosti medzi týmito dvoma závisle premennými, ale len tak, že hodnoty sa odlišujú matematicky.

Štatistické postupy

90. Cieľom je získať kvantitatívny vzťah medzi koncentráciou a závisle premennou pomocou regresnej analýzy. Možno použiť váženú lineárnu regresiu po vykonaní linearizujúcej transformácie údajov reakcie, napríklad na probitové, logitové alebo Weibullove jednotky (13), ale uprednostňujú sa techniky nelineárnej regresie, ktorými sa lepšie spracujú nevyhnutné nepravidelnosti údajov a odchýlky od hladkých rozdelení. Tieto nepravidelnosti, ak sa blížia k nulovej alebo úplnej inhibícii, sa transformáciou môžu zväčšiť

▼M7

a ovplyvniť analýzu (13). Treba si uvedomiť, že štandardné metódy analýzy s použitím probitovej, logitovej alebo Weibullovej transformácie sú určené na použitie na kvantálne údaje (napr. o úmrtnosti alebo prežití) a mali by sa upraviť tak, aby sa prispôsobili údajom o rýchlosti rastu alebo výťažku. Osobitné postupy na stanovenie hodnôt EC_x z kontinuálnych údajov možno nájsť v literatúre pod číslami (14) (15) (16) (17).

91. Pre každú závisle premennú, ktorá sa má analyzovať, sa na výpočet bodových odhadov hodnôt EC_x použije vzťah medzi koncentráciou a reakciou na ňu. Stanovia sa 95 % hranice spoľahlivosti pre každý odhad a vyhodnotí sa dobrá zhoda údajov reakcie s regresným modelom, a to buď graficky, alebo štatisticky. Regresná analýza by sa mala vykonať s použitím reakcií jednotlivých replikátov, nie priemerných hodnôt ovplyvňovanej skupiny.

92. Odhady hodnoty EC_{50} a hranice spoľahlivosti sa môžu získať aj s použitím lineárnej interpolácie metódou „bootstrap“ (18), ak sú dostupné regresné modely/metódy nevhodné pre dané údaje.

93. Na účely odhadu hodnôt LOEC, a teda aj NOEC, je potrebné porovnať priemerné hodnoty ovplyvňovaných skupín metódami analýzy rozptylu (ANOVA). Priemerná hodnota pre každú koncentráciu sa potom porovná s priemernou hodnotou kontroly s použitím príslušnej testovacej metódy (napr. Dunnettovho alebo Williamsovho testu) (19) (20) (21) (22). Treba posúdiť, či je dodržaný predpoklad normálneho rozdelenia (ND) a homogenity rozptylov (VH) pre analýzu ANOVA. Toto hodnotenie by sa malo vykonať pomocou Shapirovho-Wilksovho testu (ND) alebo Levenovho testu (VH). Nesplnenie predpokladu ND a homogenity rozptylov je niekedy možné korigovať logaritmickou transformáciou údajov. Ak je heterogenita rozptylov a/alebo odchýlka od ND extrémna a nie je možné ju korigovať transformáciou, je nutné uvažovať o analýze metódami, ako sú napríklad Bonferroniho-Welchov t-test, Jonckheereho-Terpstrov test trendu a Bonferroniho mediánový test. Ďalšie informácie o stanovení hodnoty NOEC možno nájsť v literatúre pod číslom (16).

PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

94. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália:

Jednozložkové látky:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Testovací druh

— vedecký názov a zdroj.

Podmienky testu

— trvanie a podmienky fázy založenia,

— použitý testovací postup (statický, polostatický, pulzujúci),

▼M7

— dátum začiatku testu a jeho dĺžka,

— testovacie médium, t. j. sediment a kvapalné živné médium,

— opis návrhu experimentu: rastová komora/miestnosť alebo laboratórium, testovacie nádoby a veká, objemy roztokov, dĺžka a hmotnosť testovacích rastlín na testovaciu nádobu na začiatku testu, pomer povrchu sedimentu k povrchu vody, pomer objemu sedimentu k objemu vody,

— testované koncentrácie (nominálne a merané podľa potreby) a počet replikátov na koncentráciu,

— metódy prípravy zásobných a testovacích roztokov vrátane prípadného použitia rozpúšťadiel alebo dispergantov,

— teplota počas testu,

— zdroj svetla, intenzita ožiarenia ($\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$),

— hodnoty pH testovacích a kontrolných médií, ako aj vzhľad testovacích médií na začiatku a na konci testu,

— koncentrácie kyslíka,

— metóda analýzy s príslušnými údajmi posúdenia kvality (validačné štúdie, štandardné odchýlky alebo hranice spoľahlivosti analýz),

— metódy stanovenia meraných premenných, napr. dĺžky, suchej hmotnosti, čerstvej hmotnosti,

— všetky odchýlky od tejto testovacej metódy.

Výsledky

— nespracované údaje: dĺžka výhonku a hmotnosť výhonku pre rastliny/kvetináče a iné merané premenné v každej testovacej a kontrolnej nádobe pri každom pozorovaní a analýze podľa harmonogramu hodnotenia uvedeného v tabuľke 1,

— priemery a štandardné odchýlky pre každú meranú premennú,

— rastové krivky pre každú koncentráciu,

— čas zdvojnásobenia/rýchlosť rastu v kontrole na základe dĺžky a čerstvej hmotnosti výhonku vrátane variačného koeficientu pre výťažok čerstvej hmotnosti,

— vypočítané hodnoty závisle premenných pre každý ovplyvňovaný replikát s priemernými hodnotami a variačným koeficientom pre replikáty,

— grafické znázornenie vzťahu koncentrácie a účinku,

— odhady sledovaných parametrov toxicity pre závisle premenné, napr. EC_{50}, a príslušné intervaly spoľahlivosti, hodnoty LOEC a/alebo NOEC (ak sa vypočítavajú) a štatistické metódy použité na ich stanovenie,

— ak sa použila metóda ANOVA, veľkosť účinku, ktorý možno zistiť (napr. najmenej významný rozdiel),

— každá stimulácia rastu zistená v akejkoľvek ovplyvňovanej vzorke,

▼M7

— všetky viditeľné znaky fytotoxicity, ako aj pozorovania testovacích roztokov,

— rozbor výsledkov vrátane prípadného vplyvu odchýlok od tejto testovacej metódy na výsledok testu.

LITERATÚRA

(1) Kapitola C.26 tejto prílohy: Druhy rodu Lemna, test inhibície rastu.

(2) Kapitola C.3 tejto prílohy: Sladkovodné riasy a sinice, test inhibície rastu.

(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) Kapitola C.50 tejto prílohy: Test toxicity pre *Myriophyllum spicatum* v systéme bez sedimentu.

(8) Kapitola C.28 tejto prílohy: Test toxicity chironomidae v systéme sediment – voda za použitia obohatenej vody.

(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), „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.

(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**

Dodatok 1

ZLOŽENIE SMARTOVHO A BARKOVHO MÉDIA

Zložka	Množstvo reagentu pridané do vody (*) (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 (rovnováha vzduchu)	7,9

(*) demineralizovaná (t. j. destilovaná alebo deionizovaná) voda

▼M7

Dodatok 2

DEFINÍCIE

Biomasa je čerstvá a/alebo suchá hmotnosť živej hmoty nachádzajúcej sa v populácii. V tomto teste je biomasa súhrn hlavného výhonku, všetkých bočných vetiev a všetkých koreňov.

Chemikália je látka alebo zmes.

Chloróza je zmena farby testovacieho organizmu, najmä praslenov, zo zelenej na žltkastú.

ECx je koncentrácia testovanej chemikálie rozpustenej v testovacom médiu, ktorej dôsledkom je x % (napr. 50 %) zníženie rastu rastliny druhu. *Myriophyllum spicatum* v rámci stanoveného obdobia expozície (je potrebné výslovne uviesť, ak sa odchyľuje od celkového alebo bežného trvania testu). Na jednoznačné označenie hodnoty EC odvodenej od rýchlosti rastu alebo výťažku sa používa symbol „E_rC“ pre rýchlosť rastu a symbol „E_yC“ pre výťažok, potom nasleduje použitá meraná premenná, napr. „E_rC“ (dĺžka hlavného výhonku).

Rast je nárast meranej premennej, napr. dĺžky hlavného výhonku, celkovej dĺžky bočných vetiev, celkovej dĺžky výhonku, celkovej dĺžky koreňa, čerstvej hmotnosti, suchej hmotnosti alebo počtu praslenov, počas obdobia testu.

Rýchlosť rastu (priemerná špecifická rýchlosť rastu) je logaritmický nárast meranej premennej počas obdobia expozície. *Poznámka*: Závisle premenné súvisiace s rýchlosťou rastu sú nezávislé od trvania testu, pokiaľ je rastový model nevystavených kontrolných organizmov exponenciálny.

Najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC) je najnižšia testovaná koncentrácia, pri ktorej sa pozoruje štatisticky významný účinok chemikálie na zníženie rastu (pri $p < 0,05$) v porovnaní s kontrolou v rámci daného obdobia expozície. Škodlivý účinok všetkých testovaných koncentrácií vyšších ako hodnota LOEC by však mal byť rovnaký alebo väčší ako účinky pozorované pri hodnote LOEC. Ak nie sú splnené tieto dve podmienky, je potrebné poskytnúť úplné vysvetlenie, akým spôsobom sa zvolila hodnota LOEC (a teda aj NOEC).

Merané premenné sú všetky druhy premenných, ktoré sa merajú na vyjadrenie sledovaného parametra testu s použitím jednej alebo viacerých závisle premenných. V tejto testovacej metóde sú merané premenné dĺžka hlavného výhonku, celková dĺžka bočných vetiev, celková dĺžka výhonku, celková dĺžka koreňa, čerstvá hmotnosť, suchá hmotnosť a počet praslenov.

Monokultúra je kultúra s jedným druhom rastliny.

Nekróza je odumreté (t. j. biele alebo tmavohnedé) tkanivo testovacieho organizmu.

Koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC) je testovaná koncentrácia bezprostredne pod úrovňou hodnoty LOEC.

Závisle premenná je premenná slúžiaca na odhadnutie toxicity, ktorá bola odvodená z akejkoľvek meranej premennej opisujúcej biomasu rôznymi metódami výpočtu. V tejto testovacej metóde sú závisle premennými rýchlosť rastu a výťažok, ktoré sú odvodené z meraných premenných, ako sú dĺžka hlavného výhonku, celková dĺžka výhonku, čerstvá hmotnosť, suchá hmotnosť alebo počet praslenov.

Polostatický (obnovovací) test je test, v ktorom sa testovací roztok počas testu pravidelne vymieňa v stanovených intervaloch.

Statický test je testovacia metóda bez obnovy testovacieho roztoku počas testu.

▼M7

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Sledovaný parameter testu je všeobecný faktor, ktorý sa v dôsledku testovanej chemikálie bude meniť v porovnaní s kontrolou ako cieľ testu. V prípade tejto testovacej metódy je sledovaným parametrom testu inhibícia rastu, ktorá sa dá vyjadriť rôznymi závisle premennými založenými na jednej alebo viacerých meraných premenných.

Testovacie médium je kompletné syntetické rastové médium, v ktorom rastú testovacie rastliny vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie. Testovaná chemikália sa v testovacom médiu spravidla rozpustí.

UVCB je látka neznámeho alebo variabilného zloženia, produkt komplexných reakcií alebo biologický materiál.

Výťažok je rozdiel hodnoty meranej premennej, ktorá vyjadruje množstvo biomasy, na konci obdobia expozície a hodnoty meranej premennej na začiatku obdobia expozície. Poznámka: Ak je rastový model nevystavených organizmov exponenciálny, závisle premenné založené na výťažku sa budú s dĺžkou trvania testu znižovať.

▼M8

C.52. ROZŠÍRENÝ JEDNOGENERAČNÝ REPRODUKČNÝ TEST NA RYŽOVNÍČKE JAPONSKEJ (MEOGRT)

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 240 (2015). V rámci rozšíreného jednogeneračného reprodukčného testu na ryžovníčke japonskej (MEOGRT) sa opisuje komplexná testovacia metóda založená na expozícii rýb počas viacerých generácií s cieľom poskytnúť relevantné údaje z hľadiska ekologickej nebezpečnosti a posúdenia rizika chemikálií vrátane tých, pri ktorých existuje podozrenie, že predstavujú endokrinné disruptory (EDC). Expozícia v rámci testu MEOGRT pokračuje až do vyliahnutia (do dvoch týždňov po oplodnení) v druhej generácii (F2). Na odôvodnenie užitočnosti rozšírenia testu o obdobie po vyliahnutí generácie F2 by bolo potrebné ďalšie skúmanie. V súčasnosti neexistujú dostatočné informácie, na základe ktorých by boli dostupné relevantné podmienky alebo kritériá odôvodňujúce rozšírenie testu o ďalšie obdobie v rámci generácie F2. Táto testovacia metóda sa však môže aktualizovať po posúdení nových informácií a údajov. Za určitých okolností môže byť potenciálne užitočné napríklad usmernenie o rozšírení testu o ďalšie obdobie v rámci generácie F2 tak, aby zahŕňal reprodukciu (napr. v prípade chemikálií s vysokým biokoncentračným potenciálom alebo indikácií medzigeneračných účinkov v iných taxónoch). Pomocou tejto testovacej metódy možno hodnotiť potenciálne chronické účinky chemikálií vrátane potenciálnych endokrinných disruptorov na ryby. V rámci metódy sa kladie hlavný dôraz na potenciálne účinky relevantné z hľadiska populácie (konkrétne škodlivé vplyvy na prežitie, vývoj, rast a reprodukciu) pri výpočte hodnôt koncentrácie, pri ktorej sa nepozorujú účinky (NOEC), alebo účinnej koncentrácie (EC_x), hoci je potrebné poznamenať že prístupy s využitím účinnej koncentrácie EC_x sú zriedka vhodné pre rozsiahle štúdie tohto typu, v ktorých môže byť nepraktický rastúci počet testovacích koncentrácií, ktoré majú slúžiť na určenie požadovanej hodnoty EC_x, čo môže vzhľadom na veľký počet použitých zvierat viesť aj k značným obavám z hľadiska dobrých životných podmienok zvierat. V prípade chemikálií, pri ktorých sa nevyžaduje posúdenie v prebehu viacerých generácií, alebo chemikálií, ktoré nie sú potenciálnymi endokrinnými disruptormi, môžu byť vhodnejšie iné testovacie metódy (1). Ryžovníčka japonská je vhodným druhom na použitie v tejto testovacej metóde vzhľadom na krátky životný cyklus a možnosti určiť jej genetické pohlavie (2), čo sa považuje za rozhodujúcu zložku v tejto testovacej metóde. Špecifické metódy a sledované parametre z hľadiska pozorovania, ktoré sú opísané v tejto metóde, sa vzťahujú len na ryžovníčku japonskú. V prípade iných malých druhov rýb (napr. danio pruhované) je možné prispôsobenie podobnému testovaciemu protokolu.

2. Touto testovacou metódou sa meria viacero biologických sledovaných parametrov. Hlavný dôraz sa kladie na relevantné parametre z hľadiska potenciálnych škodlivých účinkov na populáciu vrátane prežitia, vývoja výrazných znakov, rastu a reprodukcie. S cieľom poskytnúť mechanistické informácie a prepojenie medzi výsledkami z iných druhov terénnych a laboratórnych štúdií, v ktorých existujú dôkazy *a posteriori*, že chemikália vykazuje pôsobenie ako potenciálny endokrinný disruptor (napr. androgénne alebo estrogénové pôsobenie v iných testoch a skúškach), sa ďalej môžu získať ďalšie užitočné informácie meraním mRNA *vitelogenínu* (*vtg)* (alebo bielkoviny vitelogenínu, VTG), fenotypových sekundárnych pohlavných znakov (SSC) v súvislosti s genetickým pohlavím, ako aj posudzovaním histopatológie. Je potrebné poznamenať, že ak pri testovanej chemikálii alebo jej metabolitoch neexistuje podozrenie, že predstavujú endokrinné disruptory, nemusí byť potrebné merať tieto sekundárne sledované parametre a vhodnejšie môžu byť štúdie, ktoré sú menej náročné z hľadiska zdrojov a zvierat (1). Vymedzenie pojmov použitých v tejto testovacej metóde sa uvádza v dodatku 1.

▼M8

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

3. Vzhľadom na obmedzený počet testovaných chemikálií a laboratórií, ktoré sa zúčastnili na validácii tejto pomerne zložitej štúdie, sa predpokladá, že sa táto testovacia metóda prehodnotí a v prípade potreby zreviduje na základe získaných skúseností, keď bude k dispozícii dostatočný počet štúdií na posúdenie vplyvu novej koncepcie štúdie. Údaje možno použiť na úrovni 5 koncepčného rámca OECD na testovanie a hodnotenie endokrinných disruptorov (3). Testovacia metóda sa začína tým, že sa dospelá ryba (generácia F0) vystaví počas reprodukčnej fázy testovanej chemikálii. Expozícia pokračuje počas vývoja a reprodukcie v generácii F1 a liahnutia v generácii F2, vďaka čomu možno pomocou skúšky vyhodnotiť štrukturálne aj aktivačné endokrinné dráhy. Pri interpretácii sledovaných parametrov súvisiacich s endokrinným systémom možno použiť analýzu váhy dôkazov.

4. Súčasťou testu má byť dostatočný počet jedincov, aby sa zabezpečila dostatočná kapacita na vyhodnotenie sledovaných parametrov súvisiacich s reprodukciou (pozri dodatok 3), pričom zároveň sa má zabezpečiť, aby sa použil len minimálny potrebný počet zvierat z dôvodu zabezpečenia dobrých životných podmienok zvierat. Vzhľadom na veľký počet použitých pokusných zvierat je dôležité dôkladne zvážiť potrebu tohto testu v súvislosti s existujúcimi údajmi, ktoré už môžu obsahovať relevantné informácie o mnohých sledovaných parametroch testu MEOGRT. V tejto súvislosti môže do určitej miery pomôcť rámec OECD pre testovanie toxicity na rybách (1).

5. Táto testovacia metóda bola vyvinutá hlavne na rozlišovanie medzi účinkami jednotlivej látky. Ak sa však vyžaduje testovanie zmesi, je potrebné zvážiť, či poskytne prijateľné výsledky na určený regulačný účel.

6. Pred začiatkom testu je dôležité mať k dispozícii informácie o fyzikálno-chemických vlastnostiach testovanej chemikálie, najmä na to, aby bolo možné pripraviť stabilné chemické roztoky. Je potrebné mať k dispozícii aj primerane citlivú analytickú metódu na overenie koncentrácií testovanej chemikálie.

PRINCÍP TESTU

7. Test sa začína trojtýždňovou expozíciou pohlavne dospelých samcov a samíc (najmenej 12 týždňov po oplodnení) v chovných pároch, počas ktorej dochádza k distribúcii testovanej chemikálie do organizmu rodičovskej generácie (F0) podľa jej toxikokinetických vlastností. Čo najbližšie k prvému dňu štvrtého týždňa sa zozbierajú vajíčka na začatie chovu generácie F1. Počas chovu generácie F1 (celkovo 15 týždňov) sa posudzuje liahnivosť a miera prežitia. Okrem toho sa 9 – 10 týždňov po oplodnení posudzujú vzorky rýb z hľadiska vývojových sledovaných parametrov a neresenie sa vyhodnocuje počas troch týždňov v období 12 až 14 týždňov po oplodnení. Generácia F2 sa začína chovať po treťom týždni posudzovania reprodukcie a chová sa až do dokončenia liahnutia.

KRITÉRIA PLATNOSTI TESTU

8. Uplatňujú sa tieto kritériá platnosti testu:

— koncentrácia rozpusteného kyslíka má počas testu dosahovať ≥ 60 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka,

— stredná teplota vody počas celého trvania štúdie má byť v rozsahu 24 až 26 °C. Krátke odchýlky od strednej hodnoty v jednotlivých akváriách nemajú prekročiť 2 °C,

▼M8

— priemerná plodivosť kontrol v každej z generácií (F0 a F1) má byť vyššia ako 20 vajíčok na pár a deň. Fertilita všetkých vajíčok nakladených počas posudzovania má byť vyššia ako 80 %. Okrem toho má 16 z odporúčaných 24 kontrolných chovných párov (< 65 %) naklásť viac ako 20 vajíčok na pár a deň,

— liahnivosť vajíčok pri kontrolách má byť ≥ 80 % (priemer) (v každej z generácií F1 a F2),

— miera prežitia po vyliahnutí má byť v kontrolách (F1) do 3 týždňov po oplodnení ≥ 80 % (priemer) a od 3 týždňov po oplodnení do usmrtenia pri generácii F1 (t. j. 15 týždňov po oplodnení) má byť ≥ 90 % (priemer),

— malo by byť preukázateľné, že koncentrácia testovanej chemikálie v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v rozsahu ±20 % stredných nameraných hodnôt.

Hoci teplota vody nepredstavuje kritérium platnosti, replikáty v rámci testovanej skupiny sa nemajú medzi sebou štatisticky odlišovať a rovnako ani testované skupiny v rámci testu sa nemajú medzi sebou štatisticky odlišovať (na základe denných meraní teploty a s vylúčením krátkych odchýlok).

9. Hoci sa pri skupinách s vyššou expozíciou môže pozorovať znížená reprodukcia, prinajmenšom v tretej najvyššej skupine a vo všetkých nižších skupinách generácie F0 by mala byť dostatočná reprodukcia na naplnenie násadových inkubátorov. Navyše má byť dostatočná miera prežitia embryí v skupinách s treťou najvyššou expozíciou a nižšími expozíciami v generácii F1, aby bolo možné vyhodnotiť sledované parametre pri odbere vzoriek pred dosiahnutím dospelosti (pozri odseky 36 a 38 a dodatok 9). Okrem toho má byť prinajmenšom minimálna miera prežitia po vyliahnutí (~20 %) v skupine s druhou najvyššou expozíciou v generácii F1. Tieto požiadavky nepredstavujú samy osebe kritériá platnosti, ale odporúčania na to, aby bolo možné vypočítať spoľahlivé hodnoty NOEC.

10. Ak sa zistí odchýlka od kritérií platnosti testu, dôsledky by sa mali posudzovať s ohľadom na spoľahlivosť výsledkov testu a tieto odchýlky a úvahy by mali byť zahrnuté do správy o teste.

OPIS METÓDY

Prístroje

11. Bežné laboratórne vybavenie a najmä tieto zariadenia:

a) zariadenia na meranie kyslíka a pH;

b) zariadenie na stanovenie tvrdosti a alkality vody;

c) vhodné zariadenie na reguláciu teploty a podľa možnosti na kontinuálne monitorovanie;

d) nádrže z chemicky inertného materiálu a s vhodným objemom vo vzťahu k odporúčanej veľkosti násady a chovnej hustote (pozri dodatok 3);

e) vhodné presné váhy (t. j. s presnosťou ±0,5 mg).

▼M8

Voda

12. Použiteľná voda na testovanie je každá voda, v ktorej testovací druh vykazuje vhodné dlhotrvajúce prežívanie a rast. Má mať konštantnú kvalitu počas celého trvania testu. S cieľom zaistiť, že voda na riedenie neovplyvní výsledky testu neprimeraným spôsobom (napríklad tvorbou komplexov testovanej chemikálie) alebo že nebude mať nepriaznivý vplyv na reprodukčnú schopnosť násady rýb, mali by sa z nej v pravidelných intervaloch odoberať vzorky na analýzu. Ak je známe, že voda má relatívne stálu kvalitu, stačí, ak sa v nej bude napríklad raz za šesť mesiacov merať obsah ťažkých kovov (napríklad Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavných aniónov a katiónov (napríklad Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), pesticídov, celkový obsah organického uhlíka a nerozpustných pevných látok. Niektoré chemické vlastnosti vody vhodnej na riedenie sú uvedené v dodatku 2. pH vody má byť v rozsahu od 6,5 do 8,5, ale počas jednotlivého testu má byť v rozsahu ±0,5 jednotky pH.

Expozičný systém

13. Konštrukcia a materiály použité na expozičný systém nie sú špecifikované. Na konštrukciu testovacieho systému sa použije sklo, nehrdzavejúca oceľ alebo iný chemicky inertný materiál, ktorý sa nekontaminoval počas predchádzajúcich testov. Na účely tohto testu môže vhodný expozičný systém obsahovať kontinuálny prietokový systém (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Testované roztoky

14. Zásobný roztok testovanej chemikálie sa dopravuje do expozičného systému pomocou vhodného čerpadla. Prietok zásobného roztoku sa kalibruje v súlade s analytickým potvrdením testovaných roztokov pred začiatkom expozície a počas testu sa pravidelne kontroluje z hľadiska objemu. Testovaný roztok v jednotlivých komorách sa primerane obnovuje (napr. najmenej 5 obnovení objemu/deň až 16 obnovení objemu/deň alebo prietok do 20 ml/min.) v závislosti od stability testovanej chemikálie a kvality vody.

15. Testované roztoky vybraných koncentrácií sa pripravujú riedením zásobného roztoku. Zásobný roztok sa má podľa možnosti pripraviť jednoduchým miešaním alebo pretrepávaním testovanej chemikálie vo vode na riedenie mechanickým prostriedkom (napr. miešadlom a/alebo ultrazvukom). Na dosiahnutie vhodne koncentrovaného zásobného roztoku možno použiť saturačné kolóny/systémy alebo pasívne dávkovacie metódy (14). Je potrebné vyvinúť všetko úsilie na to, aby sa zabránilo použitiu rozpúšťadiel alebo nosičov, pretože: 1. určité rozpúšťadlá môžu samy osebe spôsobovať toxicitu a/alebo nežiaduce alebo neočakávané reakcie; 2. testovanie chemikálií nad hranicou ich rozpustnosti vo vode (k čomu môže často dôjsť pri použití rozpúšťadiel) môže viesť k nepresnému stanoveniu účinných koncentrácií; 3. použitie rozpúšťadiel v dlhodobejších testoch môže spôsobiť vznik značného stupňa biofilmu v súvislosti s mikrobiálnou aktivitou, ktorý môže mať vplyv na podmienky prostredia, ako aj na schopnosť udržať expozičné koncentrácie; a 4. v prípade, že neexistujú historické údaje, z ktorých vyplýva, že rozpúšťadlo neovplyvňuje výsledok štúdie, pri použití rozpúšťadiel sa vyžaduje použitie kontroly s aplikáciou rozpúšťadla, čo má dôsledky z hľadiska dobrých životných podmienok zvierat, keďže sú na uskutočnenie testu potrebné ďalšie zvieratá. V prípade ťažko testovateľných chemikálií možno rozpúšťadlo použiť ako poslednú možnosť, pričom na stanovenie najlepšej metódy je potrebné prečítať si usmerňovací dokument OECD č. 23 o testovaní toxicity ťažko testovateľných látok a zmesí vo vodnom prostredí (15). Rozpúšťadlo sa vyberie na základe chemických vlastností testovanej chemikálie a dostupnosti historických údajov o používaní rozpúšťadla. Ak sa použijú nosiče s rozpúšťadlom, okrem (negatívnych) kontrol bez aplikácie rozpúšťadla (len voda na riedenie) je potrebné vyhodnotiť aj primerané kontroly s aplikáciou rozpúšťadla. V prípade, že sa nemožno vyhnúť použitiu rozpúšťadla a vyskytne sa mikrobiálna aktivita (vznik biofilmu), počas celého testu sa odporúča v jednotlivých nádržiach (najmenej raz za týždeň) zaznamenávať vznik biofilmu/podávať správy o jeho vzniku. Koncentrácia rozpúšťadla má byť v ideálnom prípade v kontrole s aplikáciou

▼M8

rozpúšťadla a vo všetkých testovacích vzorkách konštantná. Ak sa neudržiava konštantná koncentrácia rozpúšťadla, v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla sa má použiť najvyššia koncentrácia rozpúšťadla v testovacej vzorke. V prípadoch, keď sa použije nosič s rozpúšťadlom, nemajú maximálne koncentrácie rozpúšťadla prekročiť 100 µl/l alebo 100 mg/l (15) a odporúča sa udržiavať koncentráciu rozpúšťadla čo najnižšiu (napr. < 20 µl/l), aby sa predišlo potenciálnemu účinku rozpúšťadla na merané sledované parametre (16).

Pokusné zvieratá

Výber a chov rýb

16. Pokusným druhom je ryžovníčka japonská (*Oryzias latipes*) vzhľadom na krátky životný cyklus a možnosť určiť genetické pohlavie. Hoci možno podobnému testovaciemu protokolu prispôsobiť iné malé druhy rýb, špecifické metódy a sledované parametre z hľadiska pozorovania, ktoré sú opísané v tejto testovacej metóde, sa vzťahujú len na ryžovníčku japonskú (pozri odsek 1). Pri ryžovníčke japonskej možno jednoducho dosiahnuť rozmnožovanie sa v zajatí, existujú zverejnené metódy na jej chov (17) (18) (19) a sú k dispozícii údaje z krátkodobých testov letality, testov skorých štádií života a úplného životného cyklu (5) (6) (8) (9) (20). Pri všetkých rybách sa dodržiava fotoperióda so 16 hodinami svetla a 8 hodinami tmy. Ako krmivo pre ryby sa používajú živé naupliá žiabronôžky soľnej (rod *Artemia*), ktoré možno v prípade potreby doplniť komerčne dostupným vločkovým krmivom. Komerčne dostupné vločkové krmivo treba pravidelne analyzovať, aby sa zistilo, či neobsahuje kontaminanty.

17. Pokiaľ sa dodržiavajú vhodné postupy chovu, nevyžaduje sa špecifický chovný protokol. Ryžovníčku japonskú možno napríklad chovať v 2-litrových nádržiach s 240 rybami v larválnom štádiu na nádrž do 4 týždňov po oplodnení, potom ju možno chovať v 2-litrových nádržiach s 10 rybami na nádrž do 8 týždňov po oplodnení, pričom následne sa vytvoria chovné páry, ktoré sa prenesú do 2-litrových nádrží.

Aklimatizácia a výber rýb

18. Testované ryby sa vyberajú zo zásoby jedného laboratória, pričom sa pred testom najmenej dva týždne aklimatizujú v podobných podmienkach kvality vody a osvetlenia, aké sa používajú v teste, (poznámka: toto aklimatizačné obdobie nepredstavuje obdobie *in situ* pred expozíciou). Odporúča sa, aby sa testované ryby získali z chovu v rámci laboratória, keďže preprava predstavuje pre dospelé ryby stres a môže ovplyvňovať spoľahlivé trenie. Ryby sa kŕmia naupliami žiabronôžky soľnej dvakrát denne počas obdobia chovu a počas vychytávacej fázy, pričom sa táto potrava dopĺňa komerčne dostupným vločkovým krmivom. Na začatie tohto testu s cieľom zabezpečiť primeranú replikáciu sa vyžaduje najmenej 42 chovných párov (54 chovných párov, ak sa vyžaduje kontrola s aplikáciou rozpúšťadla, sčasti pre nedostatok historických údajov, ktoré by podporovali len použitie kontroly bez aplikácie rozpúšťadla). Pri každom chovnom páre generácie F0 sa má navyše overiť zloženie chromozómov XX-XY (t. j. normálne zloženie pohlavných chromozómov v každom pohlaví), aby sa predišlo možnému začleneniu samcov spontánne obsahujúcich chromozómy XX (pozri odsek 39).

▼M8

19. Počas aklimatizačnej fázy sa zaznamenáva mortalita chovných rýb a po 48-hodinovom období ustálenia sa uplatnia tieto kritériá:

— mortalita vyššia ako 10 % chovnej populácie počas siedmich dní pred prenosom do testovacieho systému: celá násada sa vyradí,

— mortalita v rozsahu 5 % až 10 % chovnej populácie počas siedmich dní pred prenosom do testovacieho systému: aklimatizácia počas ďalších siedmich dní, o ktoré sa predĺži dvojtýždňové aklimatizačné obdobie. Ak je počas týchto dodatočných siedmich dní mortalita vyššia ako 5 %, celá násada sa vyradí,

— mortalita nižšia ako 5 % populácie počas siedmich dní pred prenosom do testovacieho systému: násada sa akceptuje.

20. Počas dvojtýždňového aklimatizačného obdobia pred testom a počas obdobia expozície nemajú byť ryby liečené na choroby a pokiaľ je to možné, liečbe chorôb je potrebné sa úplne vyhnúť. V štúdii sa nemajú používať ryby s klinickými príznakmi choroby. Uchováva sa záznam o pozorovaniach a akejkoľvek profylaktickej a terapeutickej liečbe chorôb počas obdobia chovu pred testom.

21. Vychytávacia fáza sa začína s pohlavne dimorfnými dospelými rybami s geneticky odlíšeným pohlavím z laboratórnej zásoby pohlavne dospelých zvierat chovaných pri teplote 25 ±2 °C. Pri týchto rybách sa má počas týždňa pred expozíciou preukázať plodnosť (t. j. tým, že majú životaschopné potomstvo). V rámci celej skupiny rýb použitých v teste sa hmotnosť jednotlivých jedincov podľa pohlavia na začiatku testu má udržiavať v rozsahu ±20 % aritmetického priemeru hmotností toho istého pohlavia. Na odhad priemernej hmotnosti sa pred testom odváži podvzorka rýb. Vybraté ryby majú mať najmenej 12 týždňov po oplodnení, pričom samice majú mať hmotnosť ≥ 300 mg a samce ≥ 250 mg.

KONCEPCIA TESTU

Testované koncentrácie

22. Odporúča sa použiť päť koncentrácií chemikálie plus kontroly. Pri výbere rozsahu testovacích koncentrácií je potrebné zvážiť všetky zdroje informácií vrátane kvantitatívnych vzťahov štruktúry a aktivity (QSAR), prevzatých údajov z analogických zdrojov, výsledkov testov na rybách, napríklad skúšok akútnej toxicity (kapitola C.1 tejto prílohy), krátkodobej reprodukčnej skúšky na rybách (kapitola C.48 tejto prílohy) a iných testovacích metód, napríklad kapitoly C.15, C.37, C.41, C.47 alebo C.49 tejto prílohy (21) (22) (23) (24) (25) (26), ak sú k dispozícii, alebo v prípade potreby z testu na zistenie rozsahu, ktorý prípadne zahŕňa reprodukčnú fázu. V prípade potreby sa test na zistenie rozsahu môže uskutočniť pri podmienkach (kvalita vody, testovací systém, násada zvierat) podobných tým, ktoré sa používajú v konečnom teste. Ak sa vyžaduje použitie rozpúšťadla a nie sú k dispozícii historické údaje, pomocou testu na zistenie rozsahu možno zistiť vhodnosť rozpúšťadla. Najvyššia testovaná koncentrácia by nemala presiahnuť úroveň rozpustnosti vo vode, 10 mg/l alebo 1/10 96h-LC50 (27). Najnižšia koncentrácia by mala predstavovať desať- až stonásobne nižší faktor, než je najvyššia koncentrácia. Vďaka použitiu piatich koncentrácií možno v tomto teste merať nielen vzťah medzi dávkou a odozvou, ale aj získať hodnoty najnižšej koncentrácie s pozorovaným účinkom (LOEC) a NOEC, ktoré sú potrebné na posúdenie rizika v niektorých regulatórnych programoch alebo v niektorých jurisdikciách. Faktor rozstupu medzi nominálnymi koncentráciami testovanej chemikálie medzi susediacimi úrovňami aplikovanej dávky je vo všeobecnosti ≤ 3,2.

▼M8

Replikáty v rámci testovaných skupín a kontrol

23. Je potrebné použiť minimálne šesť testovacích komôr s replikátmi na každú testovanú koncentráciu (pozri dodatok 7). Počas reprodukčnej fázy (s výnimkou generácie F0) sa na účely posúdenia plodivosti štruktúra replikátov zdvojuje a každý replikát obsahuje len jeden chovný pár (pozri odsek 42).

24. Okrem testovacích koncentrácií sa použije kontrola s vodou na riedenie a v prípade potreby kontrola s aplikáciou rozpúšťadla. Na zabezpečenie primeranej štatistickej váhy je potrebné použiť dvojnásobný počet komôr s replikátmi pre kontroly (t. j. v prípade kontrol sa má použiť najmenej dvanásť replikátov). Počas reprodukčnej fázy sa zdvojnásobuje počet replikátov v rámci kontrol (t. j. minimálne 24 replikátov, pričom každý replikát obsahuje len jeden páriaci sa pár). Po reprodukcii nemajú kontrolné replikáty obsahovať viac než 20 embryí (rýb).

POSTUP

Začiatok testu

25. Reprodukčne aktívne dospelé ryby, ktoré sa použijú na začatie generácie F0 v rámci testu, sa vyberú na základe dvoch kritérií: vek (zvyčajne viac ako 12 týždňov po oplodnení, odporúča sa však neprekročiť 16 týždňov po oplodnení) a hmotnosť (má byť $\geq$ 300 mg v prípade samíc a $\geq$ 250 mg v prípade samcov).

26. Páry zložené zo samíc a samcov spĺňajúcich uvedené špecifikácie sa premiestnia ako samostatné páry do jednotlivých nádrží replikátov, t. j. na začiatku testu bude dvanásť replikátov v rámci kontrol a šesť replikátov v skupinách s aplikovanou chemikáliou. Týmto nádržiam sa náhodne priradí testovaná skupina (napr. T1 – T5 a kontrola) a replikát (napr. A – L pri kontrolách a A – F pri skupinách s aplikovanou chemikáliou) a potom sa umiestnia do expozičného systému s príslušným prítokom do jednotlivých nádrží.

Podmienky expozície

27. Úplný súhrn parametrov a podmienok testu sa uvádza v dodatku 3. Dodržiavaním týchto špecifikácií sa majú v prípade kontrolných rýb dosiahnuť hodnoty sledovaných parametrov, ktoré sú podobné hodnotám uvedeným v dodatku 4.

28. Počas testu je potrebné merať koncentráciu rozpusteného kyslíka, pH a teplotu najmenej v jednej testovacej nádobe v každej testovanej skupine a v kontrole. S výnimkou teploty sa tieto merania uskutočňujú počas obdobia expozície najmenej raz týždenne. Priemerná teplota vody v rámci testu počas celého trvania štúdie má byť v rozsahu 24 až 26 °C. Teplota sa meria každý deň počas celého obdobia expozície. pH vody má byť v rozsahu od 6,5 do 8,5, ale počas jednotlivého testu má byť v rozsahu ±0,5 jednotky pH. Replikáty v rámci testovanej skupiny sa nemajú medzi sebou štatisticky odlišovať a rovnako ani testované skupiny v rámci testu sa nemajú medzi sebou štatisticky odlišovať (na základe denných meraní teploty a s vylúčením krátkych odchýlok).

▼M8

Dĺžka expozície

29. V rámci testu dochádza k trojtýždňovej expozícii pohlavne dospelých rýb od generácie F0. V 4. týždni približne na 24. testovací deň sa vytvorí generácia F1, chovné páry generácie F0 sa humánnym spôsobom usmrtia a zaznamená sa ich hmotnosť a dĺžka (pozri odsek 34). Za tým nasleduje expozícia generácie F1 počas ďalších 14 týždňov (spolu 15 týždňov v prípade generácie F1) a expozícia generácie F2 počas dvoch týždňov až do vyliahnutia. Celkový čas trvania testu je primárne 19 týždňov (t. j. do vyliahnutia generácie F2). Harmonogram testu sa uvádza v tabuľke 2 a ďalej je podrobne vysvetlený v dodatku 9.

Kŕmny režim

30. Ryby možno kŕmiť žiabronôžkou soľnou rodu *Artemia* (24-hodinové nauplia) *ad libitum*, pričom sa táto potrava podľa potreby dopĺňa komerčne dostupným vločkovým krmivom. Komerčne dostupné vločkové krmivo treba pravidelne analyzovať, aby sa zistilo, či neobsahuje kontaminanty, napríklad organochlórové pesticídy, polycyklické aromatické uhľovodíky (PAU), polychlórované bifenyly (PCB). Je potrebné predísť podávaniu potravy so zvýšenou úrovňou látok s endokrinným pôsobením (t. j. fytoestrogénov), ktoré by mohli narušiť reakciu v rámci testu. Neskonzumovaná potrava a fekálny materiál sa odstraňujú z testovacích nádob podľa potreby, napríklad dôkladným vyčistením dna každej nádrže odsávaním. Bočné steny a dno každej nádrže je potrebné čistiť raz alebo dvakrát týždenne (napr. oškrabaním špachtľou). Príklad harmonogramu kŕmenia sa uvádza v dodatku 5. Dávka potravy závisí od počtu rýb na replikát. Dávka potravy sa preto znižuje, ak v replikáte dochádza k mortalite.

Analytické stanovenie a merania

31. Pred začiatkom obdobia expozície treba zabezpečiť riadne fungovanie systému prísunu chemikálie. Stanoviť by sa mali všetky potrebné analytické metódy vrátane dostatočných vedomostí o stabilite chemikálie v testovacom systéme. Počas testu sa koncentrácie testovanej chemikálie stanovujú vo vhodných intervaloch, podľa možnosti aspoň raz týždenne v jednom replikáte v každej testovanej skupine so striedaním medzi replikátmi v tej istej testovanej skupine každý týždeň.

32. Počas testu by sa mali kontrolovať prietoky riediaceho a zásobného roztoku v príslušných intervaloch (napr. minimálne trikrát týždenne). Odporúča sa, aby výsledky vychádzali z nameraných koncentrácií. V prípade, že koncentrácia testovanej chemikálie v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v rozsahu ±20 % priemerných nameraných hodnôt počas celého testu, výsledky môžu vychádzať buď z nominálnych, alebo z nameraných hodnôt. V prípade chemikálií, pri ktorých dochádza k výraznej akumulácii v rybách, sa testovacie koncentrácie môžu znížiť nepriamo úmerne s rastom rýb. V takých prípadoch sa odporúča, aby sa miera obnovovania testovaného roztoku v každej komore prispôsobila tak, aby sa testovacie koncentrácie udržiavali čo najkonštantnejšie.

Pozorovanie a merané sledované parametre

33. Medzi merané sledované parametre patrí plodivosť, fertilita, liahnutie, rast a prežívanie na účely hodnotenia možných účinkov na úrovni populácie. Denne sa uskutočňujú aj pozorovania správania a akékoľvek nezvyčajné správanie sa zaznamená. Medzi ostatné mechanistické sledované parametre patria úrovne hepatickej mRNA *vtg* alebo bielkoviny VTG na základe imunologického testu (28), pohlavné fenotypové markery, ako sú charakteristické papily análnej plutvy pri samcoch, histologické hodnotenie gonadálneho pohlavia a histopatologické hodnotenie obličky, pečene a gonády (pozri zoznam sledovaných parametrov v tabuľke 1). Všetky tieto špecifické sledované parametre sa hodnotia z hľadiska určenia genetického pohlavia jedinca na základe prítomnosti alebo neprítomnosti génu *dmy* určujúceho samčie pohlavie pri ryžovníčke japonskej (pozri odsek 41). Okrem to sa hodnotí aj

▼M8

čas do trenia. Jednoduché fenotypové pomery pohlaví možno navyše odvodiť na základe informácií o počte papíl análnej plutvy, na základe čoho sa stanoví, či je jedinec ryžovníčky japonskej fenotypovo samec alebo samica. Pri tejto testovacej metóde sa neočakáva schopnosť rozpoznať mierne odchýlky od očakávaného pomeru pohlaví, keďže pri pomerne malom počte rýb na replikát sa nedosiahne dostatočná štatistická váha. Počas histopatologického posúdenia sa hodnotí aj gonáda a uskutočnia sa omnoho dôkladnejšie analýzy na posúdenie gonádového fenotypu v kontexte genetického pohlavia.

34. Hlavným účelom tejto testovacej metódy je posúdiť potenciálne relevantné účinky testovanej chemikálie z hľadiska populácie. Mechanistické sledované parametre (VTG, sekundárne pohlavné znaky a určité účinky na gonády z hľadiska histopatológie) môžu pomôcť pri stanovení, či je niektorý účinok sprostredkovaný endokrinným pôsobením. Na tieto mechanistické sledované parametre však môže mať vplyv aj systémová toxicita a iné toxicity. Následne možno podrobne posúdiť aj histopatológiu pečene a obličky s cieľom lepšie porozumieť reakciám pri mechanistických sledovaných parametroch. Ak sa však tieto podrobné hodnotenia neuskutočnia, je potrebné zaznamenať a uviesť v správe výrazné abnormality, ktoré sa mimochodom zistia počas histopatologického hodnotenia.

Humánne usmrcovanie rýb

35. Pri ukončení expozície generácií F0 a F1 a keď sa vykonáva výber podvzorky rýb pred dosiahnutím dospelosti, sa tieto ryby usmrtia vhodným množstvom anestetického roztoku [napr. trikaín metán sulfonát, MS-222 (CAS 886-86-2), 100 – 500 mg/l] tlmeného pridaním 300 mg/l $NaHCO_3$ (bikarbonát sodný, CAS 144-55-8) na zníženie podráždenia slizníc. Ak sa na rybách prejavujú príznaky značného utrpenia (vo veľmi závažnej miere a je možné spoľahlivo predpokladať smrť) a zvieratá sa považujú za moribundné, je potrebné im podať anestetikum a usmrtiť ich a na účely analýzy údajov ich považovať za uhynuté. Ak sa ryba usmrtí v dôsledku morbidity, zaznamená sa to a uvedie v správe. Ryba sa môže uchovať na účely histopatologickej analýzy (fixácia ryby na účely možnej histopatológie) v závislosti od toho, kedy počas štúdie dôjde k jej usmrteniu.

Manipulácia s vajíčkami a rybami v larválnom štádiu

Odber vajíčok od chovných párov na rozmnožovanie nasledujúcej generácie

36. Odber vajíčok sa uskutočňuje v prvý deň (alebo v prípade potreby v prvých dvoch dňoch) 4. testovacieho týždňa pri prechode z generácie F0 na F1 a 18. testovacieho týždňa pri prechode z generácie F1 na F2. 18. testovací týždeň zodpovedá dospelým rybám generácie F1 15 týždňov po oplodnení. Je dôležité deň pred odberom vajíčok z každej nádrže odstrániť všetky vajíčka, aby sa zabezpečilo, že odobraté vajíčka od chovného páru sú z jedného trenia. Samice ryžovníčky japonskej niekedy po trení nosia vajíčka v blízkosti močopohlavného otvoru, až kým ich nemôžu naklásť na substrát. Ak sa v nádrži nenachádza substrát, vajíčka možno nájsť buď prichytené k samici, alebo na dne nádrže. V závislosti od umiestnenia možno vajíčka opatrne odobrať zo samice alebo odsať z dna nádrže vo 4. testovacom týždni generácie F0 a v 18. testovacom týždni generácie F1. Všetky vajíčka odobraté v rámci testovanej skupiny sa zoskupia pred rozdelením do inkubačných komôr.

▼M8

37. Vlákna, ktoré držia vajíčka vylúčené pri trení pohromade, sa odstránia. Od každého chovného páru sa odoberú oplodnené vajíčka (do 20) (1 pár na replikát), zoskupia sa v rámci testovanej skupiny a systematicky sa rozdelia do vhodných inkubačných komôr (dodatky 6 a 7). Pomocou kvalitného stereoskopického mikroskopu možno pozorovať charakteristické črty skorého štádia oplodnenia/vývoja, napríklad vystúpenie zárodkového obalu (chória), prebiehajúce delenie buniek alebo vznik blastuly. Inkubačné komory možno umiestniť buď v samostatných inkubačných akváriách pripravených pre jednotlivé testované skupiny (v takom prípade je v nich potrebné merať parametre kvality vody a koncentrácie testovanej chemikálie), alebo v akváriu s replikátom, v ktorom budú umiestnené vyliahnuté larvy (napr. eleuteroembryo). Ak sa vyžaduje druhý deň odberu (23. testovací deň), všetky vajíčka z oboch dní sa zoskupia a potom sa systematicky rozdelia do jednotlivých replikátov testovanej skupiny.

Starostlivosť o vajíčka do vyliahnutia

38. Oplodnené vajíčka sa priebežne premiešavajú, napr. v inkubátore na vajíčka, pomocou vzduchových bublín alebo vertikálnym nakláňaním inkubátora na vajíčka. Denne sa kontroluje a zaznamenáva mortalita oplodnených vajíčok (embryí). Mŕtve vajíčka sa z inkubátorov odstránia (dodatok 9). Na 7. deň po oplodnení sa premiešavanie zastaví alebo obmedzí, aby sa oplodnené vajíčka usadili na dne inkubátora. Tým sa podporí liahnutie, ku ktorému dôjde zvyčajne v priebehu jedného alebo dvoch nasledujúcich dní. V každej skupine s aplikovanou chemikáliou a kontrole sa spočítajú plôdiky (mladé larvy; eleuteroembryo) (zlúčia sa podľa replikátov). Oplodnené vajíčka, ktoré sa nevyliahli za dvojnásobok mediánu dňa liahnutia v kontrole (zvyčajne 16 alebo 18 dní po oplodnení), sa považujú za neživotaschopné a vyradia sa.

39. Do každej nádrže s replikátom sa prenesie 12 plôdikov. Plôdiky z inkubačných komôr sa zoskupia a systematicky rozdelia do nádrží s replikátom (dodatok 7). Možno to uskutočniť náhodným výberom plôdika zo zlúčenej testovanej skupiny a postupným pridávaním jedného plôdika bez rozlišovania do akvária s replikátom. Každá z nádrží má obsahovať rovnaký počet (n = 12) vyliahnutých lariev (v každej najviac 20 lariev). Ak nie je k dispozícii dostatok plôdikov na naplnenie všetkých replikátov testovanej skupiny, odporúča sa zabezpečiť, aby sa v čo najväčšom počte replikátov nachádzalo 12 plôdikov. S plôdikmi možno bezpečne manipulovať pomocou sklenej pipety s veľkým priemerom. Všetky ďalšie plôdiky sa humánne usmrtia pomocou anestetika. Počas niekoľkých týždňov pred vytvorením chovných párov sa zaznamená deň, keď sa pri každom replikáte pozoruje prvé trenie.

Vytvorenie chovných párov

Odobratie odrezkov plutiev a stanovenie genotypového pohlavia

40. Stanovenie genotypového pohlavia prostredníctvom odrezkov plutiev sa uskutočňuje 9 až 10 týždňov po oplodnení (t. j. 12. až 13. testovací týždeň pri generácii F1). Všetkým rybám v nádrži sa podá anestetikum (pomocou schválenej metódy, napr. IACUC) a z dorzálnej alebo ventrálnej časti chvostovej plutvy každej ryby sa odoberie malá vzorka tkaniva na určenie genotypového pohlavia jedinca (29). Ryby z replikátu sa môžu v nádrži s replikátom umiestniť do malých klietok, pokiaľ možno jednotlivo. Prípadne možno do každej klietky umiestniť dve ryby, ak ich možno od seba odlíšiť. Jednou možnou metódou je pri odbere vzorky tkaniva odlišne narezať chvostovú plutvu (napr. pri jednej rybe z dorzálnej a pri druhej z ventrálnej strany).

▼M8

41. Genotypové pohlavie ryžovníčky japonskej sa určuje na základe identifikovaného a sekvenovaného génu (*dmy*), ktorý sa nachádza v chromozóme Y. Prítomnosť génu *dmy* znamená, že ide o jedinca s chromozómami XY bez ohľadu na fenotyp, zatiaľ čo chýbajúci gén *dmy* znamená, že ide o jedinca s chromozómami XX bez ohľadu na fenotyp (30) (31). Z každého odrezku sa extrahuje deoxyribonukleová kyselina (DNA) a prítomnosť alebo neprítomnosť génu *dmy* možno určiť metódami polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) [pozri dodatok 9 v kapitole C.41 tejto prílohy alebo dodatok 3 a 4 v referencii (29)].

Stanovenie chovných párov

42. Pomocou informácií o genotypovom pohlaví sa vytvoria chovné páry s chromozómami XX-XY bez ohľadu na externý fenotyp, ktorý môže byť zmenený v dôsledku expozície testovanej chemikálii. Deň po stanovení genotypového pohlavia každej ryby sa náhodne vyberú dve ryby s chromozómami XX a dve ryby s chromozómami XY z každého replikátu a vytvoria sa dva chovné páry s chromozómami XX-XY. Ak sa v replikáte nenachádzajú dve ryby s chromozómami XX alebo dve ryby s chromozómami XY, vhodné ryby je potrebné získať z iných replikátov v rámci testovanej skupiny. Prioritou je mať odporúčaný počet replikovaných chovných párov (12) v každej testovanej skupine a v kontrolách (24). Pri vytváraní chovných párov sa vylúčia ryby so zrejmými abnormalitami (problémy s plávacím mechúrom, deformity chrbtice, mimoriadne odlišnosti vo veľkosti atď.). Počas reprodukčnej fázy generácie F1 obsahuje každá nádrž s replikátom len jeden chovný pár.

Odber vzoriek rýb pred dosiahnutím dospelosti a posúdenie sledovaných parametrov

Odber vzoriek rýb, ktoré nepatria do chovných párov

43. Po vytvorení chovných párov sa ryby, ktoré nie sú vybraté na ďalší chov, humánne usmrtia na účely merania sledovaných parametrov pred dosiahnutím dospelosti v 12. – 13. testovacom týždni (F1). Je mimoriadne dôležité, aby sa s týmito rybami zaobchádzalo tak, aby bolo možné k jednotlivým rybám priradiť genotypové pohlavie určené na účely výberu chovného páru. Všetky získané údaje sa analyzujú v kontexte genotypového pohlavia konkrétnej ryby. Každá ryba sa používa na merania rôznych sledovaných parametrov vrátane: stanovenia miery prežitia mladých rýb/rýb pred dosiahnutím dospelosti [7. – 12/13. testovací týždeň (F1)], rastu do dĺžky (štandardnú dĺžku možno merať, ak sa skrátila chvostová plutva v dôsledku odberu vzoriek na analýzu genetického pohlavia. Celkovú dĺžku možno merať, ak sa na stanovenie génu *dmy* použila len časť chvostovej plutvy, dorzálna alebo ventrálna) a telesnej hmotnosti (t. j. vlhká hmotnosť, vysušené do sucha), pečeňovej hodnoty mRNA *vtg* (alebo VTG) a papíl análnej plutvy (pozri tabuľky 1 a 2). Na výpočet priemerného rastu v testovanej skupine sú potrebné aj hmotnosti a dĺžky chovných párov.

Odber vzoriek tkaniva a meranie vitelogenínu

44. Vykoná sa pitva pečene a pečeň sa uloží pri teplote ≤ –70 °C až do uskutočnenia meraní mRNA *vtg* (alebo VTG). Chvost ryby vrátane análnej plutvy sa uchová vo vhodnom fixačnom prostriedku (napr. Davidsonovom) alebo sa odfotografuje tak, aby bolo možné neskôr spočítať papily análnej plutvy. V prípade potreby sa v tomto čase môže odobrať a zakonzervovať vzorka iných tkanív (t. j. gonády). Koncentrácia VTG v pečeni sa má kvantifikovať pomocou homológnej techniky ELISA (pozri odporúčané postupy pre ryžovníčku japonskú v dodatku 6 v kapitole C.48 tejto prílohy). Prípadne existujú metódy na kvantifikáciu mRNA vtg, t. j. na extrakciu mRNA génu *vtg I* zo vzorky pečene a kvantifikáciu počtu kópií génu *vtg I* (na ng celkovej mRNA) pomocou kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie, ktoré stanovila Agentúra Spojených štátov na ochranu životného prostredia (29). Namiesto stanovenia počtu kópií génu *vtg* v kontrolných a testovaných skupinách možno pomocou

▼M8

metódy, ktorá je menej náročná z hľadiska zdrojov a má nižšiu technickú náročnosť, stanoviť relatívnu (násobnú) zmenu expresie *vtg I* z kontrolných a testovaných skupín.

Sekundárne pohlavné znaky

45. Za normálnych okolností len pohlavne dospelé samce ryžovníčky japonskej majú papily, ktoré sa vyvíjajú na spojených platničkách určitých lúčov análnej plutvy ako sekundárne pohlavné znaky, čím slúžia ako potenciálny biologický marker účinkov narúšajúcich endokrinný systém. Metóda na určenie počtu papíl análnej plutvy (počtu spojených platničiek s papilami) sa uvádza v dodatku 8. Na účely výpočtu jednoduchého pomeru pohlaví na replikát možno jedince kategorizovať ako samce alebo samice z hľadiska externého fenotypu aj na základe počtu papíl análnej plutvy na jedinca. Ryžovníčka japonská s akýmkoľvek počtom papíl análnej plutvy väčším ako nula sa považuje za samca a jedinec s nulovým počtom papíl análnej plutvy sa považuje za samicu.

Posúdenie plodivosti a fertility

46. Plodivosť a fertilita sa posudzujú v 1. až 3. testovacom týždni v generácii F0 a v 15. až 17. testovacom týždni v generácii F1. Počas 21 za sebou nasledujúcich dní sa odoberajú vajíčka od každého chovného páru. Vajíčka sa každé ráno opatrne odoberú od samíc zachytených v sieťach a/alebo sa odsajú z dna akvária. Pri každom chovnom páre v jednotlivých replikátoch sa denne zaznamenáva plodivosť a fertilita. Plodivosť sa vymedzuje ako počet vajíčok nakladených pri trení a fertilita sa funkčne vymedzuje ako počet oplodnených a životaschopných vajíčok v čase počítania. Spočítanie sa má uskutočniť čo najskôr po odbere vajíčok.

47. Plodivosť replikátu sa zaznamenáva denne ako počet vajíčok na chovný pár, ktorý sa analyzuje odporúčanými štatistickými postupmi na základe priemerov replikátov. Fertilita replikátu je súčet počtu oplodnených vajíčok vyprodukovaných chovným párom, ktorý sa vydelí súčtom počtu vajíčok vyprodukovaných daným párom. Štatisticky sa fertilita analyzuje ako pomer na replikát. Liahnivosť replikátu je podiel počtu plôdikov a počtu nasadených embryí (zvyčajne 20). Štatisticky sa liahnivosť analyzuje ako pomer na replikát.

Odber vzoriek dospelých rýb a posúdenie sledovaných parametrov

Odber vzoriek rýb, ktoré patria do chovných párov

48. Po 17. testovacom týždni (t. j. po tom, ako sa úspešne začala generácia F2) sa dospelé ryby z generácie F1 humánne usmrtia a vyhodnotia sa rôzne sledované parametre (pozri tabuľky 1 a 2). Vytvorí sa obrazový záznam análnej plutvy na posúdenie papíl análnej plutvy (pozri dodatok 8) a/alebo sa chvost priamo za močopohlavným otvorom odstráni a zafixuje, aby bolo možné neskôr stanoviť počet papíl. V tomto čase možno odobrať a archivovať vzorku časti chvostovej plutvy, aby bolo v prípade potreby možné overiť genetické pohlavie (*dmy)*. V prípade potreby sa môže odobrať vzorka tkaniva na účely zopakovania analýzy *dmy*, aby bolo možné overiť genetické pohlavie konkrétnej ryby. Pred ponorením celého tela do vhodného fixačného prostriedku (napr. Davidsonov fixačný prostriedok) sa telová dutina otvorí, aby bola možná perfúzia pomocou daného fixačného prostriedku. Ak sa však pred fixáciou vykoná vhodný krok na zabezpečenie priepustnosti, nie je potrebné otvorenie telovej dutiny.

▼M8

Histopatológia

49. Každá ryba sa histologicky posudzuje z hľadiska výskytu patologických javov v gonadálnom tkanive (30) (29). Ako sa uvádza v odseku 33, na ostatné mechanistické sledované parametre vyhodnocované v rámci tejto skúšky (t. j. VTG, sekundárne pohlavné znaky a určité gonadálne účinky z hľadiska histopatológie) môže mať vplyv systémová toxicita alebo iné toxicity. Následne možno podrobne posúdiť aj histopatológiu pečene a obličky s cieľom lepšie porozumieť reakciám pri mechanistických sledovaných parametroch. Ak sa však tieto podrobné hodnotenia neuskutočnia, je potrebné zaznamenať a uviesť v správe výrazné abnormality, ktoré sa mimochodom zistia počas histopatologického hodnotenia. Je možné zvážiť postup smerom k nižším úrovniam, a to od testovanej skupiny s najvyššou dávkou (v porovnaní s kontrolou) po testovanú skupinu s dávkou nespôsobujúcou žiadny účinok, odporúča sa však zohľadniť usmernenie v oblasti histopatológie (29). Všetky vzorky sa zvyčajne spracujú/pripravia sa z nich rezy a ďalej ich vyhodnocuje patológ. Ak sa použije prístup založený na postupe smerom k nižším úrovniam, je potrebné uviesť, že pri postupe RSCABS (Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices) sa vychádza z očakávania, že so zvyšujúcimi sa úrovňami dávky sa bude zvyšovať aj biologický účinok (patologický jav). Pri skúmaní len jednej vysokej dávky bez medziľahlých dávok tak nebude možné dosiahnuť dostatočnú štatistickú váhu. Ak na stanovenie toho, že táto vysoká dávka nemá žiaden účinok, nie je potrebná štatistická analýza, môže byť tento prístup prijateľný. Z tohto hodnotenia sa odvodzuje aj gonádový fenotyp.

Ďalšie pozorovania

50. Na základe testu MEOGRT sa získavajú údaje, pomocou ktorých možno súčasne vyhodnotiť (napr. v analýze váhy dôkazov) aspoň dva všeobecné typy dráh nepriaznivého účinku (AOP), ktoré vedú k reprodukčnej poruche: a) dráhy spostredkované endokrinným systémom zahŕňajúce narušenie endokrinnej osi hypotalamus – hypofýza – gonády (HPG) a b) dráhy, ktoré spôsobujú zníženie prežívania, rastu (dĺžka a hmotnosť) a reprodukcie prostredníctvom toxicity nesprostredkovanej endokrinným systémom. Súčasťou tohto testu sú aj sledované parametre, ktoré sa zvyčajne merajú v testoch chronickej toxicity, ako je test úplného životného cyklu a test skorých štádií života, a možno ich použiť na posúdenie nebezpečenstva, ktoré predstavujú spôsoby toxického účinku nesprostredkované endokrinným systémom aj dráhy toxicity sprostredkovanej endokrinným systémom. Počas testu sa denne uskutočňujú pozorovania správania a akékoľvek nezvyčajné správanie sa zaznamená. Okrem toho sa zaznamená mortalita a vypočíta sa miera prežitia po selekciu rýb (6./7. testovací týždeň), miera prežitia od selekcie po odber vzoriek jedincov pred dosiahnutím dospelosti (9 – 10 týždňov po oplodnení) a miera prežitia od vytvorenia párov po výber vzorky dospelých rýb.

Tabuľka 1

Prehľad sledovaných parametrov testu MEOGRT (*)

Vývojové štádium	Sledovaný parameter	Generácia
embryo (2 týždne po oplodnení)	liahnutie (% a čas do liahnutia)	F1, F2
mladý jedinec (4 týždne po oplodnení)	miera prežitia	F1
jedinec pred dosiahnutím dospelosti (9 alebo 10 týždňov po oplodnení)	miera prežitia	F1
	rast (dĺžka a hmotnosť)	

▼M8

Vývojové štádium	Sledovaný parameter	Generácia
	vitelogenín (mRNA alebo bielkovina)	
	sekundárne pohlavné znaky (papily análnej plutvy)	
	pomer pohlaví z externého hľadiska	
	čas do prvého trenia	
dospelý jedinec (12 – 14 týždňov po oplodnení)	rozmnožovanie (plodivosť a fertilita)	F0, F1
dospelý jedinec (15 týždňov po oplodnení)	miera prežitia	F1
	rast (dĺžka a hmotnosť)	
	Sekundárne pohlavné znaky (papily análnej plutvy)	
	Histopatológia (gonáda, pečeň, oblička)	

(*) Tieto sledované parametre sa majú štatisticky analyzovať

HARMONOGRAM

51. Test je uvedený v harmonograme testu MEOGRT znázornenom v tabuľke 2. Súčasťou testu MEOGRT sú 4 týždne expozície dospelých jedincov generácie F0 a 15 týždňov expozície jedincov generácie F1, ako aj obdobie expozície druhej generácie (F2) až do vyliahnutia (2 týždne po oplodnení). Súhrn činností v priebehu testu MEOGRT sa uvádza v dodatku 9.

Tabuľka 2

Harmonogram expozície a merania sledovaných parametrov v teste MEOGRT

Harmonogram expozície a sledovaných parametrov v teste MEOGRT

F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																		1	2
Testovací	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Označenie vývojového štádia				**embryo**						**larva**					**mladý jedinec**			**jedinec pred dosiahnutím**	**dospelý jedinec**
Sledované parametre																			
plodivosť	F_0														F_1				
plodnosť	F_0														F_1				
liahnutie					F_1														F_2
miera prežitia						F_1						F_1						F_1	
rast				F_0								F_1						F_1	
vitelogenín												F_1							
sekundárne pohlavné znaky												F_1						F_1	
histopatológia																		F_1	
Testovací týždeň	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- V koncepcii pokusu sa používa 7 skupín replikátov
  - 5 pre skupiny s aplikovanou chemikáliou
  - 2 pre kontrolné skupiny (4 v prípade použitia rozpúšťadla)
- Koncepcia v rámci skupiny
  - 12 replikátov na účely reprodukcie, patológie dospelých jedincov a sekundárnych pohlavných znakov (10. až 18 týždeň)
  - 6 replikátov na účely liahnutia, miery prežitia, Vtg a, pri jedincoch pred dosiahnutím dospelosti, sekundárnych pohlavných znakov a rastu (1. až 9. týždeň)

Vtg: vitelogenín

▼M8

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Štatistická analýza

52. Keďže sa genotypové pohlavie určuje pre všetky testované ryby, údaje je potrebné analyzovať samostatne z hľadiska každého genotypového pohlavia (t. j. samce XY a samice XX). V opačnom prípade sa výrazne zníži štatistická váha analýzy. Pri štatistických analýzach údajov by sa podľa možnosti malo vychádzať z postupov uvedených v dokumente OECD Súčasné prístupy k štatistickej analýze údajov o ekotoxicite: usmernenie k uplatňovaniu (32). V dodatku 10 sa uvádza ďalšie usmernenie k štatistickej analýze.

53. Koncepcia testu a výber štatistických testov by mali poskytovať dostatočnú váhu na detekciu zmien biologického významu v sledovaných parametroch, pri ktorých sa má uvádzať hodnota NOEC (32). Uvedenie príslušných účinných koncentrácií a parametrov môže závisieť od regulačného rámca. Je potrebné identifikovať percentuálnu zmenu v každom sledovanom parametri, ktorú je dôležité zistiť alebo odhadnúť. Koncepcia pokusu by sa mala prispôsobiť tak, aby to bolo možné. Nie je pravdepodobné, že rovnaká percentuálna zmena bude platiť pre všetky sledované parametre, a nie je pravdepodobné ani to, že sa podarí navrhnúť uskutočniteľný pokus, ktorý bude spĺňať tieto kritériá pre všetky sledované parametre, preto je v záujme správneho naplánovania pokusu dôležité zamerať sa na sledované parametre, ktoré sú dôležité pre daný pokus. V dodatku 10 je k dispozícii štatistický vývojový diagram a usmernenie s cieľom pomôcť pri spracovaní údajov a pri výbere najvhodnejšieho štatistického testu alebo modelu, ktorý sa použije. Možno použiť aj iné štatistické prístupy za predpokladu, že sú vedecky podložené.

54. V každom súbore replikátov bude potrebné analyzovať variabilitu použitím analýzy rozptylu alebo kontingenčnej tabuľky a na základe tejto analýzy použiť dostatočne vhodné metódy štatistickej analýzy. Na to, aby bolo možné mnohonásobné porovnávanie medzi výsledkami pre jednotlivé koncentrácie a pre kontroly, sa pri spojitých reakciách odporúča postup na základe trendu (napr. Jonckheerov-Terpstrov test trendu). V prípade, že údaje nezodpovedajú monotónnej závislosti reakcie od koncentrácie, mal by sa použiť Dunnettov alebo Dunnov test (podľa potreby po vhodnej transformácii údajov).

55. Z hľadiska plodivosti sa počty vajíčok zaznamenávajú denne, ale možno ich analyzovať ako celkové počty vajíčok alebo ako opakované meranie. V dodatku 10 sa uvádzajú podrobnosti o spôsobe analýzy tohto sledovaného parametra. Pre histopatologické údaje, ktoré sú v podobe skóre závažnosti, bol vytvorený nový štatistický test RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) (33).

56. Je potrebné uviesť všetky sledované parametre pozorované v testovaných skupinách s aplikovaním testovanej chemikálie, ktoré sa významne líšia od príslušných kontrol.

Úvahy v súvislosti s analýzou údajov

Používanie úrovní narušenia skupiny s určitou koncentráciou chemikálie

57. Pri rozhodovaní, či replikát alebo celá skupina s určitou koncentráciou chemikálie vykazuje zjavnú toxicitu a mala by sa vylúčiť z analýzy, sa zohľadňuje viacero faktorov. Zjavná toxicita je vymedzená > 4 mortalitami v ktoromkoľvek z replikátov v období od 3 do 9 týždňov po oplodnení, ktoré nemožno vysvetliť technickou chybou. Iné príznaky zjavnej toxicity zahŕňajú krvácanie, abnormálne správanie, abnormálne vzory plávania, anorexiu a akékoľvek iné klinické známky choroby. V prípade

▼M8

subletálnych toxických príznakov môžu byť potrebné kvalitatívne hodnotenia, ktoré by sa vždy mali vykonať porovnaním s kontrolnou skupinou s vodou na riedenie (len čistá voda). Ak sa zjavná toxicita vyskytuje pri testovaných skupinách s najvyššou dávkou, odporúča sa, aby sa tieto skupiny vylúčili z analýzy.

Kontroly s aplikáciou rozpúšťadla

58. O použití rozpúšťadla by sa malo uvažovať až ako o poslednej možnosti, ak sa zvážili všetky ostatné možnosti aplikovania chemikálie. Ak sa použije rozpúšťadlo, mala by sa zároveň vykonať analýza kontroly s vodou na riedenie. Po skončení testu by sa malo vykonať hodnotenie potenciálnych vplyvov rozpúšťadla. To sa dosiahne štatistickým porovnaním kontrolnej skupiny s aplikáciou rozpúšťadla a kontrolnej skupiny s vodou na riedenie. Medzi najrelevantnejšie sledované parametre na posúdenie v rámci tejto analýzy patria faktory rastu (hmotnosť), keďže na ne môžu mať vplyv celkové toxicity. Ak sa zistia štatisticky významné rozdiely v týchto sledovaných parametroch medzi kontrolnou skupinou s vodou na riedenie a kontrolnou skupinou s aplikáciou rozpúšťadla, je potrebné na základe najlepšieho odborného úsudku určiť, či nedošlo k narušeniu platnosti testu. Ak sa tieto dve kontroly líšia, testované skupiny vystavené chemikálii sa majú porovnať s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla, pokiaľ nie je známe, že sa uprednostňuje porovnanie s kontrolou s vodou na riedenie. Ak neexistuje štatisticky významný rozdiel medzi týmito dvomi kontrolnými skupinami, odporúča sa, aby sa testované skupiny vystavené testovanej chemikálii porovnali so zoskupenými kontrolami (kontrolné skupiny s aplikáciou rozpúšťadla a s vodou na riedenie), pokiaľ nie je známe, že sa uprednostňuje porovnanie buď len s kontrolnou skupinou s vodou na riedenie, alebo len s kontrolnou skupinou s aplikáciou rozpúšťadla.

Správa o teste

59. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália: fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

— údaje na identifikáciu chemikálie.

Jednozložkové látky:

— fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď. (vrátane obsahu organického uhlíka, ak to je vhodné).

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

— charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Testovaný druh:

— vedecký názov, kmeň, ak je dostupný, zdroj a metóda zberu oplodnených vajíčok a následnej manipulácie.

Podmienky testu:

— fotoperiódy,

— koncepcia testu (napr. veľkosť a materiál komory a objem vody, počet testovacích komôr a replikátov, počet plôdikov na replikát),

▼**M8**

— metóda prípravy zásobných roztokov a frekvencia obnovy (ak bol použitý solubilizačný prostriedok, mal by sa uviesť spolu s jeho koncentráciou),

— metóda dávkovania testovanej chemikálie (napr. čerpadlá, riediace systémy),

— miera výťažnosti metódy a nominálne testované koncentrácie, kvantifikačný limit, priemery nameraných hodnôt a ich štandardné odchýlky v testovacích nádobách a metóda, ktorou boli dosiahnuté, a dôkaz, že sa namerané hodnoty týkajú koncentrácií testovanej chemikálie v skutočnom roztoku,

— vlastnosti vody na riedenie: pH, tvrdosť vody, teplota, koncentrácia rozpusteného kyslíka, úrovne zvyškového chlóru (ak boli merané), celkový obsah organického uhlíka (ak bol meraný), nerozpustené pevné látky (ak boli merané), salinita v testovacom médiu (ak bola meraná) a akékoľvek iné vykonané merania,

— nominálne testované koncentrácie, priemery nameraných hodnôt a ich štandardné odchýlky,

— kvalita vody v testovacích nádobách: pH, teplota (meraná denne) a koncentrácia rozpustného kyslíka,

— podrobné informácie o kŕmení (napr. druh potravy, zdroj, dávkované množstvo a frekvencia).

Výsledky:

— dôkaz, že kontroly splnili celkové kritériá validity,

— tieto údaje týkajúce sa kontroly (vrátane kontroly s aplikáciou rozpúšťadla, ak sa použila) a testovaných skupín: liahnutie (liahnivosť a čas do vyliahnutia) v generáciách F1 a F2, miera prežitia po vyliahnutí v generácii F1, rast (dĺžka a telesná hmotnosť) v generácii F1, genotypové pohlavie a pohlavná diferenciácia (napr. sekundárne pohlavné znaky na základe papíl análnej plutvy a gonadálnej histológie) v generácii F1, fenotypové pohlavie v generácii F1, sekundárne pohlavné znaky (papily análnej plutvy) v generácii F1, mRNA *vtg* (alebo bielkovina VTG) v generácii F1, histopatologické posúdenie (gonáda, pečeň a obličky) v generácii F1 a reprodukcia (plodivosť a fertilita) v generácii F0, F1 (pozri tabuľky 1 a 2),

— prístup uplatnený pri štatistickej analýze (regresná analýza alebo analýza rozptylu) a spracovaní údajov (použité štatistické testy alebo modely),

— koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC) pre každú posudzovanú reakciu,

— najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC) (pri p = 0,05) pre každú posudzovanú reakciu; v prípade potreby hodnota EC_x pre každú posudzovanú reakciu vrátane intervalov spoľahlivosti (napr. 90 % alebo 95 %) a grafu zavedeného modelu použitého na jej výpočet, sklon krivky závislosti veličiny od koncentrácie, vzorec regresného modelu, odhadované parametre modelu a ich štandardné chyby,

— akákoľvek odchýlka od tejto testovacej metódy a odchýlky od kritérií prijateľnosti a úvahy o možných dôsledkoch v súvislosti s výsledkom testu.

▼M8

60. V prípade výsledkov merania sledovaných parametrov sa uvádzajú priemerné hodnoty a ich štandardné odchýlky (na základe replikátov aj koncentrácií, ak je to možné).

LITERATÚRA

(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. K dispozícii na adrese: 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) Kapitola C.15 tejto prílohy, Ryby, krátkodobý test toxicity na embryách a vývojovom štádiu plodového vaku.

(22) Kapitola C.37 tejto prílohy, 21-dňový test na rybách: Krátkodobý skríning estrogénneho a androgénneho pôsobenia a inhibícia aromatázy.

(23) Kapitola C.41 tejto prílohy, Test pohlavného vývinu rýb.

(24) Kapitola C.48 tejto prílohy, Krátkodobý reprodukčný test na rybách.

(25) Kapitola C.47 tejto prílohy, Test toxicity v ranom štádiu vývoja rýb.

(26) Kapitola C.49 tejto prílohy, Test akútnej toxicity na rybích embryách (FET).

(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**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Chemikália: látka alebo zmes.

ELISA: enzýmové imunosorbentové stanovenie.

Plodivosť = počet vajíčok.

Fertilita = počet životaschopných vajíčok/plodivosť.

Vidlicová dĺžka (FL) označuje dĺžku od špičky rypáka po koniec stredných lúčov chvostových plutiev a používa sa pri rybách, pri ktorých je ťažké rozoznať, kde sa končí chrbtica (www.fishbase.org).

Liahnivosť = počet plôdikov/počet embryí nasadených do inkubátora.

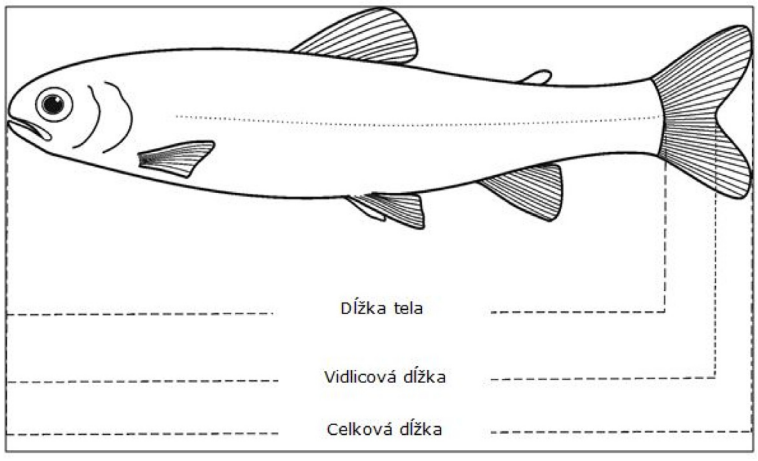
IACUC: Výbor pre inštitucionálnu starostlivosť o zvieratá a ich používanie.

Dĺžka tela (SL) označuje dĺžku ryby meranú od špičky rypáka po zadný koniec posledného stavca alebo po zadný koniec stredu bočnej časti hypurálnej kosti. Jednoducho povedané, v tomto rozmere nie je zahrnutá dĺžka chvostovej plutvy. (www.fishbase.org)

Celková dĺžka (TL) označuje dĺžku od špičky rypáka po koniec dlhšieho laloka chvostovej plutvy, spravidla meranú s lalokmi stlačenými pozdĺž stredovej čiary. Meria sa dĺžka priamky, teda nie so zakrivením tela (www.fishbase.org).

Obrázok 1

Opis rôznych používaných dĺžok



ECx: (účinná koncentrácia pre x % účinok) je koncentrácia, ktorá počas daného obdobia expozície vyvolá x % účinok na testované organizmy v porovnaní s kontrolnou skupinou. Napríklad EC50 je koncentrácia, pri ktorej sa odhaduje, že počas vymedzeného obdobia expozície vyvolá účinok na sledovaný ukazovateľ testu v 50 % exponovanej populácie.

Prietokový test je test s neustálym prietokom testovaných roztokov cez testovací systém počas trvania expozície.

Os HPG: os hypotalamus – hypofýza – gonády.

▼**M8**

IUPAC: Medzinárodná únia pre čistú a aplikovanú chémiu.

Veľkosť násady: vlhká hmotnosť rýb na objem vody.

Najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC) je najnižšia testovaná koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej je účinok chemikálie štatisticky významný (pri $p < 0,05$) v porovnaní s kontrolou. Škodlivý účinok všetkých testovaných koncentrácií vyšších ako hodnota LOEC by však mal byť rovnaký alebo väčší ako účinky pozorované pri hodnote LOEC. Ak nie sú splnené tieto dve podmienky, je potrebné poskytnúť úplné vysvetlenie, akým spôsobom sa zvolila hodnota LOEC (a teda aj NOEC). Usmernenie sa uvádza v dodatkoch 5 a 6.

Stredná letálna koncentrácia (LC50): predstavuje koncentráciu testovanej chemikálie, ktorá sa odhadne ako letálna pre 50 % testovaných organizmov počas trvania testu.

Koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC) je testovaná koncentrácia chemikálie ihneď pod LOEC, ktorá pri porovnaní s kontrolou nemá štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) počas daného obdobia expozície.

SMILES: zjednodušený systém zadávania molekulárnych štruktúr.

Chovná hustota: počet rýb na objem vody.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

VTG: vitelogenín. Je to fosfolipoglykoproteín, slúžiaci ako prekurzor proteínov vaječného žĺtka, ktorý sa normálne vyskytuje v telách pohlavne aktívnych samíc všetkých vajcorodých druhov.

WPF: týždne po oplodnení.

▼**M8**

Dodatok 2

NIEKTORÉ CHEMICKÉ VLASTNOSTI VODY VHODNEJ NA RIEDENIE

Látka	Koncentračný limit
Tuhé častice	5 mg/l
Celkový obsah organického uhlíka	2 mg/l
Neionizovaný amoniak	1 µg/l
Zvyškový chlór	10 µg/l
Celkový obsah organofosforových pesticídov	50 ng/l
Celkový obsah organochlórových pesticídov a polychlórovaných bifenylov	50 ng/l
Celkový obsah organického chlóru	25 ng/l
Hliník	1 µg/l
Arzén	1 µg/l
Chróm	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Meď	1 µg/l
Železo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikel	1 µg/l
Zinok	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Ortuť	100 ng/l
Striebro	100 ng/l

▼**M8**

Dodatok 3

PODMIENKY TESTU MEOGRT

1. Odporúčaný druh	ryžovníčka japonská (*Oryzias latipes*)
2. Typ testu	s nepretržitým prietokom
3. Teplota vody	Nominálna testovacia teplota je 25 °C. Priemerná teplota v každej nádrži počas celého testu je 24 – 26 °C.
4. Kvalita osvetlenia	Fluorescenčné svietidlá (so širokým spektrom a dosahujúce ~150 lúmenov/m^2) (~150 luxov).
5. Fotoperióda	16 hodín svetla a 8 hodín tmy
6. Veľkosť násady	F0: 2 dospelé jedince/replikát; F1: začína sa maximálne s 20 vajíčkami (embryami)/replikát, so znížením na 12 embryí/replikát pri vyliahnutí, potom 2 dospelé jedince (chovný pár s chromozómami XX-XY) 9 – 10 týždňov po oplodnení v reprodukčnej fáze
7. Minimálny využiteľný objem testovacej komory	1,8 l (napr. rozmery testovacej komory: 18 × 9 × 15 cm)
8. Výmeny objemu testovaných roztokov	od minimálne 5 obnovení objemu/deň do 16 obnovení objemu/deň (alebo prietok do 20 ml/min.)
9. Vek testovaných organizmov na začiatku	F0: > 12 týždňov po oplodnení, odporúča sa však neprekročiť 16 týždňov po oplodnení
10. Počet organizmov na replikát	F0: 2 ryby (pár samec – samica); F1: maximálne 20 rýb (vajíčok)/replikát (získané z chovných párov v generáciách F0 a F1).
11. Počet testovaných skupín	5 skupín s aplikovanou testovanou chemikáliou plus príslušné kontroly
12. Počet replikátov na testovanú skupinu	minimálne 6 replikátov na skupinu s aplikovanou chemikáliou a minimálne 12 na kontrolu a na kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla, ak sa používa (v reprodukčnej fáze generácie F1 sa počet replikátov zdvojnásobuje)
13. Počet organizmov na test	minimálne 84 rýb v generácii F0 a 504 v generácii F1. (Ak sa používa kontrola s aplikáciou rozpúšťadla, počet rýb v generácii F0 je 108 a v generácii F1 je 648.) Počítaná jednotka predstavuje štádium po eleuteroembryu.
14. Kŕmny režim	Ryby sa kŕmia žiabronôžkou soľnou rodu *Artemia* (24-hodinové naupliá) *ad libitum*, pričom sa táto potrava podľa potreby dopĺňa komerčne dostupným vločkovým krmivom (príklad harmonogramu kŕmenia na zabezpečenie primeraného rastu a vývoja a podporu spoľahlivej reprodukcie sa nachádza v dodatku 5).

▼**M8**

15. Prevzdušňovanie	žiadne, pokiaľ sa koncentrácia rozpusteného kyslíka nebude blížiť k < 60 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka
16. Voda na riedenie	čistá povrchová, studňová alebo rekonštituovaná voda alebo odchlórovaná voda z vodovodu
17. Obdobie expozície	primárne 19 týždňov (od generácie F0 po vyliahnutie generácie F2)
18. Biologické sledované parametre (primárne)	liahnivosť (F1 a F2); miera prežitia [F1, od vyliahnutia do 4 týždňov po oplodnení (koniec štádia larvy/začiatok štádia mladej ryby), od 4 do 9 (alebo 10) týždňov po oplodnení (od začiatku štádia mladej ryby po štádium ryby pred dosiahnutím dospelosti) a od 9 do 15 týždňov po oplodnení (štádium pred dosiahnutím dospelosti až po usmrtenie dospelej ryby)]; rast (F1, dĺžka a hmotnosť 9 a 15 týždňov po oplodnení); sekundárne pohlavné znaky (F1, papily análnej plutvy 9 a 15 týždňov po oplodnení); vitelogenín (F1, mRNA *vtg* alebo bielkovina VTG 15 týždňov po oplodnení); fenotypové pohlavie (F1, prostredníctvom histológie gonády 15 týždňov po oplodnení); reprodukcia (F0 a F1, plodivosť a fertilita počas 21 dní); čas do trenia (F1) a histopatológia (F1, gonáda, pečeň a oblička 15 týždňov po oplodnení)
19. Kritériá platnosti testu	Koncentrácia rozpusteného kyslíka ≥ 60 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka; priemerná teplota vody počas celého testu 24 – 26 °C; úspešná reprodukcia ≥ 65 % samičiek v kontrolách; priemerná denná plodivosť ≥ 20 vajíčok v kontrolách; liahnivosť ≥ 80 % (priemer) v kontrolách (v každej z generácií F1 a F2); miera prežitia po vyliahnutí do 3 týždňov po oplodnení ≥ 80 % (priemer) a od 3 týždňov po oplodnení do usmrtenia v rámci danej generácie ≥ 90 % (priemer) v kontrolách (F1), koncentrácie testovanej chemikálie v roztoku sa majú uspokojivo udržiavať v rozsahu ±20 % priemerných nameraných hodnôt.

▼M8

Dodatok 4

USMERNENIE K TYPICKÝM HODNOTÁM KONTROL

Je potrebné poznamenať, že hodnoty týchto kontrol vychádzajú z obmedzeného počtu validačných štúdií a môžu podliehať zmenám na základe ďalších skúseností.

Rast

Hmotnosť a dĺžka sa merajú pri všetkých rybách vybratých do vzorky 9 (alebo 10) a 15 týždňov po oplodnení. Pri postupe podľa tohto protokolu sa dosiahne 9 týždňov po oplodnení očakávaná vlhká hmotnosť 85 – 145 mg pri samcoch a 95 – 150 mg pri samiciach. Očakávaná hmotnosť 15 týždňov po oplodnení je 250 – 330 mg pri samcoch a 280 – 350 mg pri samiciach. Hoci pri jednotlivých rybách môžu existovať značné odchýlky od týchto rozsahov, priemerné hmotnosti kontrol, ktoré by boli výrazne mimo týchto rozsahov, najmä ak by boli pod spodnou hranicou, by naznačovali problémy v súvislosti s kŕmením, riadením teploty, kvalitou vody, chorobami alebo kombináciu týchto faktorov.

Liahnutie

Úspešnosť liahnutia v kontrolách je zvyčajne okolo 90 %, nie sú však zriedkavé ani hodnoty dosahujúce len 80 %. Úspešnosť liahnutia nižšia ako 75 % môže naznačovať nedostatočné premiešavanie vyvíjajúcich sa vajíčok alebo nedostatočnú starostlivosť pri manipulácii s vajíčkami, napríklad ak sa včas neodstraňujú mŕtve vajíčka, čo vedie k napadnutiu hubami.

Miera prežitia

Miery prežitia od vyliahnutia do 3 týždňov po oplodnení a po 3 týždňoch po oplodnení sú v prípade kontrol zvyčajne 90 % alebo viac, v skorých štádiách života však ani miery prežitia dosahujúce v prípade kontrol len 80 % nepredstavujú dôvod na znepokojenie. Miery prežitia nižšie ako 80 % by v prípade kontrol boli dôvodom na obavy a môžu naznačovať nedostatočné čistenie akvárií, čo vedie k stratám rýb v larválnom štádiu v dôsledku chorôb alebo udusenia z dôvodu nízkych úrovní rozpusteného kyslíka. K mortalite môže dôjsť aj v dôsledku zranenia počas čistenia nádrže alebo stratou rýb v larválnom štádiu cez odtokový systém nádrže.

Gén vitelogenínu

Zatiaľ čo sa absolútne úrovne génu *vitelogenínu* (*vtg*), vyjadrené ako počet kópií/ng celkovej mRNA, môžu medzi laboratóriami výrazne líšiť v dôsledku použitých postupov alebo prístrojového vybavenia, pomer *vtg* má byť pri kontrolných samiciach približne dvestokrát vyšší v porovnaní s kontrolnými samcami. Nie je nezvyčajné, ak tento pomer dosahuje 1 000- až 2 000-násobok, pomery nižšie ako 200 sú však podozrivé a môžu naznačovať problémy s kontamináciou vzorky alebo problémy s postupom a/alebo použitými reagentmi.

Sekundárne pohlavné znaky

Normálny rozsah sekundárnych pohlavných znakov, ktorý sa vymedzuje ako celkový počet segmentov v plutvových lúčoch papíl análnej plutvy, v prípade samcov predstavuje 40 – 80 segmentov 9 – 10 týždňov po oplodnení. 15 týždňov po oplodnení má byť tento počet v rozsahu 80 – 120 v prípade kontrolných samcov a 0 v prípade kontrolných samíc. Z nevysvetliteľných dôvodov dochádza v zriedkavých prípadoch k tomu, že pri niektorých samcoch nie sú 9 týždňov po oplodnení prítomné papily, ale keďže sa papily vyvinú pri všetkých kontrolných samcoch do 15. týždňa po oplodnení, je to s najväčšou pravdepodobnosťou spôsobené oneskoreným vývojom. Prítomnosť papíl pri kontrolných samiciach naznačuje, že sa v populácii vyskytujú samce s chromozómami XX.

▼**M8**

Samce s chromozómami XX

Bežný všeobecný výskyt samcov s chromozómami XX v rámci kultúry je zvyčajne približne 4 % alebo menej pri teplote 25 °C, pričom miera výskytu sa zvyšuje pri vyššej teplote. Je potrebné vykonať kroky s cieľom minimalizovať podiel samcov s chromozómami XX v populácii. Keďže sa zdá, že pri výskyte samcov s chromozómami XX zohráva úlohu genetická zložka a ide preto o dedičný jav, monitorovanie kultivačnej násady a zabezpečenie toho, aby sa samce s chromozómami XX nepoužívali na rozmnožovanie kultivačnej násady, predstavuje účinný prostriedok na zníženie výskytu samcov s chromozómami XX v populácii.

Aktivita trenia

Denne je potrebné monitorovať aktivitu trenia v kontrolných replikátoch pred uskutočnením merania plodivosti. S cieľom potvrdiť aktivitu trenia možno kontrolné páry kvalitatívne posudzovať vizuálne. 12 – 14 týždňov po oplodnení by malo dochádzať k treniu pri väčšine kontrolných párov. Nízky počet párov, ktoré sa trú, v tomto čase naznačuje možné problémy so zdravím, s imunitou alebo dobrými životnými podmienkami rýb.

Plodivosť

Zdravé a správne kŕmené jedince ryžovníčky japonskej vo veku 12 – 14 týždňov po oplodnení sa vo všeobecnosti trú denne, pričom každý deň vyprodukujú 15 až 50 vajíčok. Z hľadiska produkcie vajíčok má 16 z odporúčaných 24 kontrolných chovných párov (> 65 %) naklásť viac ako 20 vajíčok na pár a deň, pričom tento počet môže dosiahnuť až 40 vajíčok za deň. Nižšie než uvedené množstvo môže naznačovať, že páry, ktoré sa trú, sú nezrelé, podvyživené alebo choré.

Fertilita

Percentuálny podiel oplodnených vajíčok v prípade kontrolných párov, ktoré sa trú, je zvyčajne vyšší než 90 %, pričom nie sú nezvyčajné hodnoty dosahujúce 95 % a vyššie. Miery fertility nižšie ako 80 % v prípade kontrolných vajíčok sú podozrivé a môžu naznačovať nezdravé jedince alebo nevhodné kultivačné podmienky.

▼M8

Dodatok 5

PRÍKLAD HARMONOGRAMU KŔMENIA

Príklad harmonogramu kŕmenia na zabezpečenie primeraného rastu a vývoja a podporu spoľahlivej reprodukcie sa uvádza v tabuľke 1. Odchýlky od tohto harmonogramu kŕmenia môžu byť prijateľné, odporúča sa však ich testovanie s cieľom overiť dosiahnutie prijateľného rastu a reprodukcie. Na to, aby bolo možné dodržať navrhovaný harmonogram kŕmenia, je potrebné pred začiatkom testu stanoviť suchú hmotnosť žiabronôžky soľnej na objem suspenzie žiabronôžky soľnej. Možno to dosiahnuť odvážením vymedzeného objemu suspenzie žiabronôžky soľnej, ktorá sa nechala 24 hodín schnúť pri teplote 60 °C na vopred odvážených miskách. Na zohľadnenie hmotností solí v suspenzii sa identický objem rovnakého soľného roztoku, aký sa použil v suspenzii, takisto vysuší, odváži a odpočíta od hmotnosti vysušenej suspenzie žiabronôžky soľnej. Alternatívne možno žiabronôžku soľnú prefiltrovať a prepláchnuť destilovanou vodou pred sušením, vďaka čomu nebude potrebné merať hmotnosť zvyškového obsahu solí. Tieto informácie slúžia na prepočítanie údajov v tabuľke zo suchej hmotnosti žiabronôžky soľnej na objem suspenzie žiabronôžky soľnej, ktorá predstavuje kŕmnu dávku na jednu rybu. Okrem toho sa odporúča, aby sa týždenne vážili alikvoty suspenzie žiabronôžky soľnej s cieľom overiť suchú hmotnosť žiabronôžky soľnej podávanej ako krmivo.

Tabuľka 1

Príklad harmonogramu kŕmenia

Čas (po vyliahnutí)	Žiabronôžka soľná (suchá hmotnosť v mg/ryba/deň)
1. deň	0,5
2. deň	0,5
3. deň	0,6
4. deň	0,7
5. deň	0,8
6. deň	1,0
7. deň	1,3
8. deň	1,7
9. deň	2,2
10. deň	2,8
11. deň	3,5
12. deň	4,2
13. deň	4,5
14. deň	4,8
15. deň	5,2
16. – 21. deň	5,6

▼**M8**

Čas (po vyliahnutí)	Žiabronôžka soľná (suchá hmotnosť v mg/ryba/deň)
4. týždeň	7,7
5. týždeň	9,0
6. týždeň	11,0
7. týždeň	13,5
8. týždeň – usmrtenie	22,5

▼**M8**

Dodatok 6

PRÍKLADY KOMORY NA INKUBÁCIU VAJÍČOK

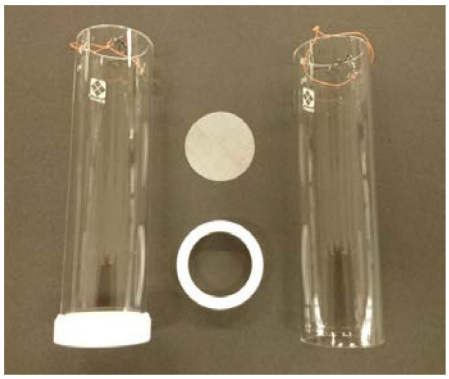
Príklad A





Tento inkubátor sa skladá z rozdelenej sklenej odstredivkovej skúmavky pripojenej pomocou objímky z nehrdzavejúcej ocele a upevnenej na mieste pomocou vrchného skrutkovacieho odstredivkového uzáveru. Cez uzáver prechádza tenká trubica zo skla alebo z nehrdzavejúcej ocele, ktorej koniec sa nachádza v blízkosti zaobleného dna a ktorá slúži na jemné vpúšťanie vzduchu, aby dochádzalo k nadnášaniu vajíčok a zníženiu prenosu saprofytických hubových infekcií medzi vajíčkami, pričom sa takisto uľahčuje chemická výmena medzi inkubátorom a chovnou nádržou.

Príklad B



▼**M8**



Tento inkubátor sa skladá zo skleného valca (s priemerom 5 cm a dĺžkou 10 cm) a mriežky z nehrdzavejúceho drôtu (rozmery mriežky: φ 0,25 a 32), ktorá je upevnená k spodnej časti valca pomocou krúžku z PTFE. Tieto inkubátory sú zavesené v nádržiach na zdvíhacej tyči a vertikálne sa pretrepávajú (s amplitúdou približne 5 cm) v cykle vhodnom pre vajíčka ryžovníčky japonskej (približne každé 4 sekundy).

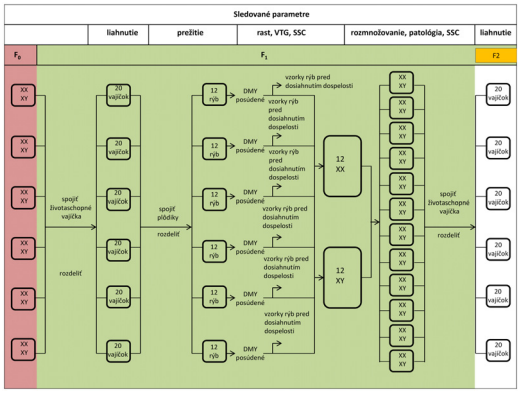
▼M8

Dodatok 7

SCHEMATICKÝ DIAGRAM ZOSKUPOVANIA A NASADZOVANIA REPLIKÁTOV POČAS TESTOVACEJ METÓDY MEOGRT

Obrázok 1

Zoskupovanie a nasadzovanie replikátov počas testu MEOGRT. Na obrázku je znázornená jedna skupina s aplikovanou chemikáliou alebo ½ kontroly. V dôsledku zoskupovania sa nezachováva identita replikátu počas celého testu. Výraz „vajíčka“ označuje životaschopné, oplodnené vajíčka (ekvivalentné embryám).



Skupiny s aplikovanou chemikáliou a replikácia

V rámci tejto testovacej metódy sa odporúča päť skupín s aplikovanou testovanou chemikáliou pomocou materiálov technickej akostnej triedy a negatívna kontrola. Počet replikátov na skupinu s aplikovanou chemikáliou nezostáva počas testu MEOGRT konštantný a počet replikátov v kontrolnej skupine predstavuje dvojnásobok počtu použitého v danej skupine s aplikovanou testovanou chemikáliou. V generácii F0 sa v každej skupine s aplikovanou testovanou chemikáliou nachádza šesť replikátov, zatiaľ čo v skupine negatívnej kontroly sa nachádza 12 replikátov. Dôrazne sa odporúča nepoužívať rozpúšťadlá a v prípade, že sa použijú, je potrebné v správe o teste MEOGRT uviesť odôvodnenie použitia a výberu rozpúšťadla. Ak sa použije rozpúšťadlo, sú ďalej potrebné dva druhy kontrol: a) kontrola s aplikáciou rozpúšťadla a b) negatívna kontrola. Obe tieto kontrolné skupiny majú obsahovať úplnú množinu replikátov vo všetkých bodoch v rámci harmonogramu testu MEOGRT. Počas celého vývoja testovaných organizmov v generácii F1 (a v generácii F2 do vyliahnutia) zostáva uvedená štruktúra replikátov rovnaká. V dospelom štádiu, keď sa vytvárajú chovné páry generácie F1, sa počet replikátov rozmnožujúcich sa párov na testovanú skupinu optimálne zdvojnásobuje, preto existuje až 12 replikovaných párov v každej skupine s aplikovanou chemikáliou a 24 replikovaných párov v kontrolnej skupine (a v prípade potreby ďalších 24 replikovaných párov v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla). Stanovenie liahnutia z embryí vyprodukovaných pri trení párov generácie F1 sa uskutočňuje v rovnakej štruktúre replikátov ako v prípade embryí vyprodukovaných pri trení párov generácie F0, čo predstavuje na začiatku šesť replikátov na skupinu s aplikovanou testovanou chemikáliou a 12 replikátov v kontrolných skupinách.

▼**M8**

Dodatok 8

URČENIE POČTU PAPÍL ANÁLNEJ PLUTVY

Hlavné materiály a reagenty

— stereoskopický mikroskop (s pripojenou voliteľnou kamerou),

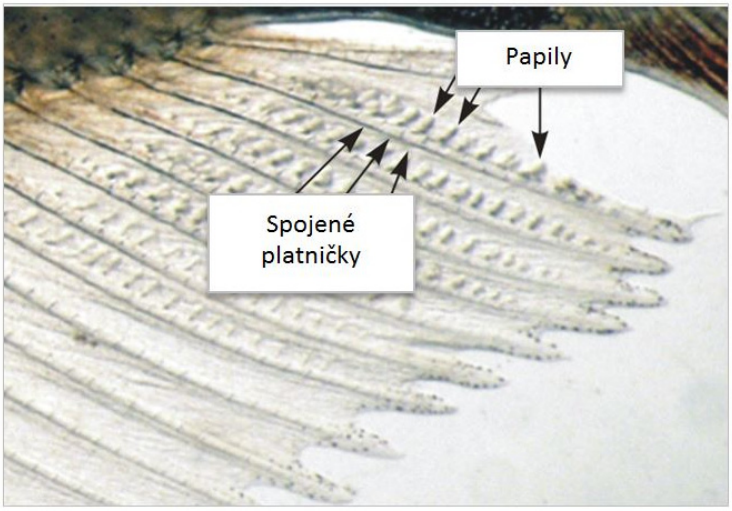
— fixačný prostriedok [napr. Davidsonov (Bouinov sa neodporúča)], ak sa počet nestanovuje na základe obrazového záznamu.

Postupy

Po pitve sa má vytvoriť obrazový záznam análnej plutvy, aby bolo možné ľahko stanoviť počet papíl análnej plutvy. Hoci je odporúčanou metódou vytvorenie obrazového záznamu, análnu plutvu možno zafixovať v Davidsonovom alebo inom vhodnom fixačnom prostriedku približne počas 1 minúty. Je dôležité, aby bola análna plutva počas fixácie umiestnená naplocho, čím sa uľahčí stanovenie počtu papíl. Telo ryby s análnou plutvou možno uložiť v Davidsonovom alebo inom vhodnom fixačnom prostriedku až do analýzy. Spočítajte spojené platničky (**obrázok 1**) s papilami, ktoré prečnievajú zo zadného okraja spojenej platničky.

Obrázok 1

Papily análnej plutvy



▼M8

Dodatok 9

PODROBNÝ HARMONOGRAM TESTU MEOGRT

1. – 3. testovací týždeň (F0)

Pri rybách generácie F0, ktoré sa trú a ktoré spĺňajú kritériá výberu (pozri odseky 16 – 20), sa uskutoční trojtýždňová expozícia s cieľom vystaviť gaméty a gonadálne tkanivá testovanej chemikálii. V každej nádrži replikátu je umiestnený jeden chovný pár rýb (chovný pár so samicou s chromozómami XX a samcom s chromozómami XY). Vajíčka vyprodukované pri trení sa zberajú, stanovuje sa ich počet a posudzuje sa fertilita počas 21 za sebou nasledujúcich dní od 1. testovacieho dňa.

4. testovací týždeň (F0 a F1)

Uprednostňuje sa zber oplodnených a životaschopných vajíčok (embryí) v jeden deň. Ak však počet embryí nie je dostatočný, môžu sa zbierať počas dvoch dní. Ak zber prebieha počas dvoch dní, všetky embryá v rámci daných testovaných skupín, ktoré sa zozbierali v prvý deň, sa zlúčia s embryami zozbieranými na druhý deň. Potom sa všetky zlúčené embryá pre každú testovanú skupinu náhodne rozdelia do jednotlivých inkubátorov replikátov v počte 20 embryí na inkubátor. Denne sa kontroluje a zaznamenáva mortalita oplodnených vajíčok (embryí). Mŕtve vajíčka sa z inkubátorov odstránia (smrť oplodnených vajíčok môže predovšetkým v ranných štádiách naznačovať výrazná strata priehľadnosti a zmena v zafarbení spôsobená koaguláciou a/alebo vyzrážaním bielkovín, čo vedie k bielemu nepriehľadnému vzhľadu; OECD 2010).

Poznámka: Ak sa pri jednej testovanej skupine vyžaduje druhý deň zberu, je tento postup potrebné uskutočniť vo všetkých testovaných skupinách (vrátane kontrol). Ak po druhom dni zberu nie je k dispozícii dostatočný počet embryí v rámci testovanej skupiny na nasadenie 20 embryí na inkubátor, znížte počet embryí nasadených v rámci tejto konkrétnej testovanej skupiny na 15 embryí na inkubátor. Ak nie je k dispozícii dostatočný počet embryí na nasadenie 15 embryí na inkubátor, znížte počet inkubátorov replikátov tak, aby bolo možné nasadiť do každého inkubátora 15 embryí. Navyše je možné v generácii F0 pridať viac chovných párov na testovanú skupinu a kontroly s cieľom vyprodukovať viac vajíčok, aby sa dosiahol odporúčaný počet 20 na replikát.

Na 24. testovací deň sa chovné páry generácie F0 humánnym spôsobom usmrtia a zaznamená sa hmotnosť a dĺžka. V prípade potreby možno chovné páry generácie F0 chovať ešte ďalšie 1 – 2 dni, aby sa znovu začala generácia F1.

5. – 6. testovací týždeň (F1)

Jeden až dva dni pred predpokladaným začiatkom liahnutia zastavte alebo obmedzte premiešavanie vajíčok počas inkubácie, aby sa urýchlilo liahnutie. Ako sa embryá každý deň liahnu, plôdiky sa zoskupia podľa testovanej skupiny a systematicky sa rozdelia do jednotlivých nádrží replikátov s larvami v rámci konkrétnej testovanej skupiny tak, aby v žiadnej nebolo viac ako 12 plôdikov. Uskutočňuje sa to náhodným výberom plôdikov, ktoré sa bez rozlišovania po jednom umiestňujú do za sebou nasledujúcich replikátov, pričom sa postupuje podľa poradia replikátov konkrétnej testovanej skupiny, až kým sa vo všetkých replikátoch v rámci príslušnej testovanej skupiny nenachádza 12 plôdikov. Ak nie je k dispozícii dostatok plôdikov na naplnenie všetkých replikátov, zabezpečte, aby sa v čo najväčšom počte replikátov nachádzalo 12 plôdikov, aby bolo možné začať s fázou F1.

Vajíčka, ktoré sa nevyliahli za dvojnásobok mediánu dňa liahnutia v kontrole, sa považujú za neživotaschopné a vyradia sa. Zaznamená sa počet plôdikov a v každom replikáte sa vypočíta úspešnosť liahnutia (liahnivosť).

▼M8

7. – 11. testovací týždeň (F1)

Denne sa vo všetkých replikátoch kontroluje a zaznamenáva prežitie rýb v larválnom štádiu. Na 43. testovací deň sa v každom replikáte zaznamená počet rýb, ktoré prežili, ako aj pôvodný počet plôdikov umiestnených do replikátu (nominálne dvanásť). Možno tak vypočítať percentuálny podiel prežitia od vyliahnutia po štádium pred dosiahnutím dospelosti.

12. testovací týždeň (F1)

Na 78. – 85. testovací deň sa z chvostovej plutvy každej ryby odoberie malá vzorka na určenie genotypového pohlavia jedinca (t. j. odobratie odrezkov plutiev) v prípade všetkých rýb. Tieto informácie sa použijú pri vytváraní chovných párov.

Do troch dní po stanovení genotypového pohlavia každej ryby sa náhodne vytvorí 12 chovných párov na testovanú skupinu a 24 párov na kontrolu. Dve ryby s chromozómami XX a XY z každého replikátu sa náhodne vyberú a zoskupia podľa pohlavia a potom sa z nich na základe náhodného výberu vytvorí chovný pár (t. j. pár s chromozómami XX – XY). Vytvorí sa najmenej 12 replikátov na skupinu s aplikovanou chemikáliou a najmenej 24 replikátov pre kontrolu, pričom v každom replikáte sa nachádza jeden chovný pár. Ak v replikáte nie sú na účely zoskupenia k dispozícii dve ryby s chromozómami XX alebo dve ryby s chromozómami XY, ryby s vhodným pohlavným genotypom je potrebné získať z iných replikátov v rámci danej testovanej skupiny.

Zvyšné ryby (najviac 8 rýb na replikát) sa humánne usmrtia a použijú sa ako vzorky na meranie rôznych sledovaných parametrov pri jedincoch pred dosiahnutím dospelosti. Údaje o géne *dmy* (XX alebo XY) pre všetky vzorky rýb pred dosiahnutím dospelosti sa uchovávajú, aby bolo možné priradiť údaje o všetkých sledovaných parametroch ku genetickému pohlaviu jednotlivých rýb.

13. – 14. testovací týždeň (F1)

Expozícia pokračuje v čase, keď sa chovné páry zložené z rýb pred dosiahnutím dospelosti vyvíjajú na dospelé ryby. Na 98. testovací deň (t. j. deň pred začiatkom zberu vajíčok) sa odstránia vajíčka, ktoré sa nachádzajú v akváriách aj na samiciach.

15. – 17. testovací týždeň (F1)

Vajíčka vyprodukované pri trení sa v každom replikáte zberajú denne počas 21 za sebou nasledujúcich dní a posudzujú sa z hľadiska plodivosti a fertility.

18. testovací týždeň (opakovanie 4. testovacieho týždňa) (F1 a F2)

Na 120. testovací deň ráno sa v každej nádrži replikátu uskutoční zber vajíčok. Odobraté vajíčka sa posúdia a oplodnené vajíčka (s odstránenými vláknami) od každého z chovných párov sa zoskupia podľa testovanej skupiny a systematicky sa rozdelia do komôr na inkubáciu vajíčok tak, aby sa v každom inkubátore nachádzalo 20 oplodnených vajíčok. Inkubátory možno umiestniť do samostatných inkubačných nádrží pripravených pre jednotlivé testované skupiny alebo do nádrže replikátu, v ktorej sa po vyliahnutí budú nachádzať vyliahnuté larvy. Uprednostňuje sa zber embryí v jeden deň, ak však počet embryí nie je dostatočný, môžu sa zbierať počas dvoch dní. Ak zber prebieha počas dvoch dní, všetky embryá v rámci daných testovaných skupín, ktoré sa zozbierali v prvý deň, sa zlúčia s embryami zozbieranými na druhý deň. Potom sa všetky zlúčené embryá pre každú testovanú skupinu náhodne rozdelia do jednotlivých inkubátorov replikátov v počte 20 embryí na inkubátor. Poznámka: Ak sa pri jednej testovanej skupine vyžaduje druhý deň zberu, je tento postup potrebné uskutočniť vo všetkých testovaných skupinách (vrátane kontrol). Ak po druhom dni zberu nie je k dispozícii dostatočný počet embryí v rámci testovanej skupiny na nasadenie 20 embryí na inkubátor, znížte počet embryí nasadených v rámci tejto konkrétnej testovanej skupiny na 15 embryí na inkubátor. Ak nie je k dispozícii dostatočný počet embryí na nasadenie 15 embryí na inkubátor, znížte počet inkubátorov replikátov tak, aby bolo možné nasadiť do každého inkubátora 15 embryí.

▼**M8**

Na 121. testovací deň (alebo na 122. testovací deň, aby sa zabezpečil správny začiatok generácie F2) sa chovné páry generácie F1 humánnym spôsobom usmrtia a analyzujú sa z hľadiska sledovaných parametrov dospelých rýb. V prípade potreby možno chovné páry generácie F1 chovať ešte ďalšie 1 – 2 dni, aby sa znovu začala generácia F2.

19. – 20. testovací týždeň (F2)

Jeden až dva dni pred predpokladaným začiatkom liahnutia zastavte alebo obmedzte premiešavanie vajíčok počas inkubácie, aby sa urýchlilo liahnutie. Ak sa test ukončí do dokončenia liahnutia v generácii F2, plôdiky sa každý deň zaznamenajú a vyradia. (Embryá, ktoré sa nevyliahli počas predĺženého inkubačného času, ktorý je vymedzený ako dvojnásobok mediánu dňa liahnutia v kontrole, sa považujú za neživotaschopné.)

▼M8

Dodatok 10

ŠTATISTICKÁ ANALÝZA

Typy biologických údajov získaných v teste MEOGRT nie sú jedinečné pre tento test a s výnimkou údajov týkajúcich sa patológie bolo vytvorených množstvo vhodných štatistických metodík na primerané analyzovanie podobných údajov v závislosti od ich charakteristík, a to vrátane normality, homogenity rozptylu, toho, či je koncepcia štúdie vhodná na testovanie hypotéz alebo regresnú analýzy, na parametrické alebo neparametrické testy atď. Všeobecnou zásadou je, že pri navrhovaných štatistických analýzach sa vychádza z odporúčaní OECD v súvislosti s údajmi o ekotoxicite (OECD 2006). Na obrázku 2 sa nachádza vývojový diagram na prijímanie rozhodnutí v súvislosti s analýzou údajov testu MEOGRT.

Predpokladá sa, že pri množinách údajov sa budú najčastejšie vyskytovať monotónne reakcie. Okrem toho je potrebné zvážiť rozdiel pri použití jednostranného alebo dvojstranného štatistického testu. Pokiaľ neexistuje biologické odôvodnenie, na základe ktorého by sa jednostranný test považoval za nevhodný, odporúča sa použitie jednostranných testov. Hoci sa v nasledujúcej časti odporúčajú určité štatistické testy, ak sa vyvinú vhodnejšie a/alebo výkonnejšie štatistické metódy, ktoré možno použiť pri konkrétnych údajoch získaných v teste MEOGRT, majú sa použiť tieto štatistické testy, aby sa využili ich výhody.

Údaje z testu MEOGRT sa analyzujú samostatne pre každé genotypové pohlavie. Na analýzu údajov týkajúcich sa rýb so zmeneným pohlavím (samce s chromozómami XX alebo samice s chromozómami XY) sú k dispozícii dve stratégie. 1. Všetky údaje týkajúce sa rýb so zmeneným pohlavím v celom teste sa cenzurujú s výnimkou situácie, keď zmena pohlavia prevláda v jednotlivých replikátoch. 2. Údaje týkajúce sa všetkých rýb so zmeneným pohlavím sa ponechajú v množine údajov a analyzujú sa na základe genotypu.

Histopatologické údaje

Histopatologické údaje sa uvádzajú v podobe skóre závažnosti, ktoré sa hodnotia pomocou novovytvoreného štatistického postupu RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) (Green a kol., 2014). Pomocou *Raovej-Scottovej* úpravy sa zachovávajú informácie o replikácii v rámci testu a v postupe s označením *by Slices* je začlenené biologické očakávanie, že skóre závažnosti majú tendenciu zvyšovať sa so zvyšujúcimi sa koncentráciami testovanej chemikálie. Pri jednotlivých diagnostických postupoch sa na základe výstupu RSCABS určuje, pri ktorých skupinách s aplikovanou chemikáliou dochádza v porovnaní s kontrolami k vyššej prevalencii patologických javov, ako aj súvisiaca úroveň závažnosti.

Údaje týkajúce sa plodivosti

Súčasťou analýz údajov týkajúcich sa plodivosti je Jonckheerov-Terpstrov test trendu alebo Williamsov test s cieľom určiť účinky aplikovania testovanej chemikálie, a to za predpokladu, že údaje zodpovedajú monotónnej závislosti reakcie od koncentrácie. V prípade step-down testu trendu sa všetky porovnávania uskutočňujú na úrovni významnosti 0,05 a neuplatňuje sa úprava na základe počtu porovnaní. Očakáva sa, že údaje zodpovedajú monotónnej závislosti reakcie od koncentrácie, možno to však overiť vizuálnou kontrolou údajov alebo stanovením lineárnych a kvadratických kontrastov stredných hodnôt aplikovania testovanej chemikálie po transformácii údajov podľa poradia. Ak kvadratický kontrast nie je významný a lineárny kontrast je nevýznamný, uskutoční sa testovanie trendov. V opačnom prípade sa použije Dunnettov test s cieľom určiť účinky aplikovania testovanej chemikálie, ak majú údaje normálne rozdelenie s homogénnymi rozptylmi. Ak uvedené požiadavky nie sú splnené, použije sa Dunnov test s Bonferonniho-Holmovou úpravou. Všetky uvedené testy sa uskutočňujú nezávisle od akéhokoľvek celkového F-testu alebo Kruskalovho-Wallisovho testu. Podrobnejšie údaje sa uvádzajú v dokumente OECD 2006.

▼M8

Ak je to štatisticky odôvodnené, možno použiť alternatívne metódy, napr. generalizovaný lineárny model so zohľadnením chýb v Poissonovom rozdelení v súvislosti s počtami vajíčok (bez transformácie) (Cameron a Trividi, 2013). V prípade použitia alternatívneho prístupu sa odporúča využiť poradenstvo v oblasti štatistiky.

Denný počet vajíčok v rámci jednej generácie

Model ANOVA vychádza z parametrov Y=čas*čas+ aplikovanie testovanej chemikálie + * aplikovanie testovanej chemikálie + čas*aplikovanie testovanej chemikálie + *čas* aplikovanie testovanej chemikálie so zahrnutím náhodných účinkov replikátu (generácia* aplikovanie testovanej chemikálie), čo umožňuje zohľadniť nerovnaké zložky rozptylu oboch typov medzi generáciami. Parametrom čas sa tu označuje frekvencia počítania vajíčok (napr. deň alebo týždeň). Ide o analýzu na základe opakovaných meraní s koreláciami medzi pozorovaniami na rovnakých replikátoch, pričom sa zohľadňuje povaha údajov získaných z opakovaných meraní.

Hlavné účinky aplikovania testovanej chemikálie sa testujú pomocou Dunnettovho (alebo Dunnettovho-Hsuovho) testu, ktorý zahŕňa úpravu na základe počtu porovnaní. Potrebné sú úpravy na základe hlavného účinku generácie a času, keďže pre tieto dva faktory neexistuje „kontrolná“ úroveň a každá dvojica úrovní predstavuje porovnanie, ktoré je možným predmetom záujmu. Pokiaľ ide o tieto dva hlavné účinky, ak je F-test pri hlavnom účinku významný na úrovni 0,05, možno bez ďalšej úpravy testovať párové porovnania medzi úrovňami daného faktora na úrovni 0,05.

Súčasťou modelu sú dvojfaktorové a trojfaktorové interakcie, keďže hlavný účinok, napríklad v prípade času, nemusí byť významný, hoci má čas významný vplyv na výsledky. Ak je preto dvojfaktorová a trojfaktorová interakcia zahŕňajúca čas významná na úrovni 0,05, možno bez ďalšej úpravy akceptovať porovnania úrovní času na úrovni významnosti 0,05.

Ďalej nasledujú F-testy významnosti aplikovania testovanej chemikálie v rámci času, tzv. rezy v tabuľke ANOVA. Ak je napríklad rez pre aplikovanie testovanej chemikálie v rámci generácie F1 a času 12 významný na úrovni 0,05, možno bez ďalšej úpravy akceptovať párové porovnania aplikovania testovanej chemikálie v rámci generácie F1 a času 12 na úrovni 0,05. Podobné postupy sa vzťahujú na testy týkajúce sa času v rámci generácie F1 a aplikovania testovanej chemikálie a na testy týkajúce sa generácie v rámci času a aplikovania testovanej chemikálie.

A nakoniec, v prípade porovnaní, ktoré nepatria ani do jednej z vyššie uvedených kategórií, je potrebné porovnania upraviť pomocou Bonferroniho-Holmovej úpravy podľa hodnôt p. Ďalšie informácie o analýzach takýchto modelov možno nájsť v zdrojoch Hocking (1985) a Hochberg a Tamhane (1987).

Alternatívne sa nespracované údaje zaznamenajú a uvedú v správe o štúdii ako plodivosť (počet vajíčok) na replikát za každý deň. Vypočíta sa stredná hodnota nespracovaných údajov replikátu a použije sa transformácia druhej odmocniny. Uskutoční sa jednosmerná analýza ANOVA na transformovaných stredných hodnotách replikátu a následne sa vypočítajú kontrasty Dunnettovou metódou. Užitočná môže byť aj vizuálna kontrola údajov o plodivosti pre každú testovanú skupinu a/alebo replikát pomocou bodového grafu, v ktorom sa zobrazujú údaje v priebehu času. Umožňuje to neformálne posúdenie potenciálnych účinkov v priebehu času.

Všetky ostatné biologické údaje

Pri štatistických analýzach sa vychádza z východiskového predpokladu, že pri správnom výbere dávky budú údaje monotónne. Údaje sa tak považujú za monotónne a formálne sa vyhodnocuje ich monotónnosť pomocou lineárnych a kvadratických kontrastov. Ak sú údaje monotónne, odporúča sa na mediány replikátu použiť Jonckheerov-Terpstrov test trendu (podľa OECD 2006). Ak je kvadratický kontrast významný a lineárny kontrast nie je významný, údaje sa považujú za nemonotónne.

▼**M8**

Ak sú údaje nemonotónne, najmä z dôvodu nižšej reakcie v jednej alebo dvoch testovaných skupinách s najvyššou dávkou, je potrebné zvážiť cenzurovanie množiny údajov tak, aby sa analýza uskutočnila bez uvedených testovaných skupín. Toto rozhodnutie bude potrebné prijať na základe odborného úsudku a všetkých dostupných údajov, obzvlášť údajov, ktoré naznačujú zjavnú toxicitu pri uvedených úrovniach aplikovania testovanej chemikálie.

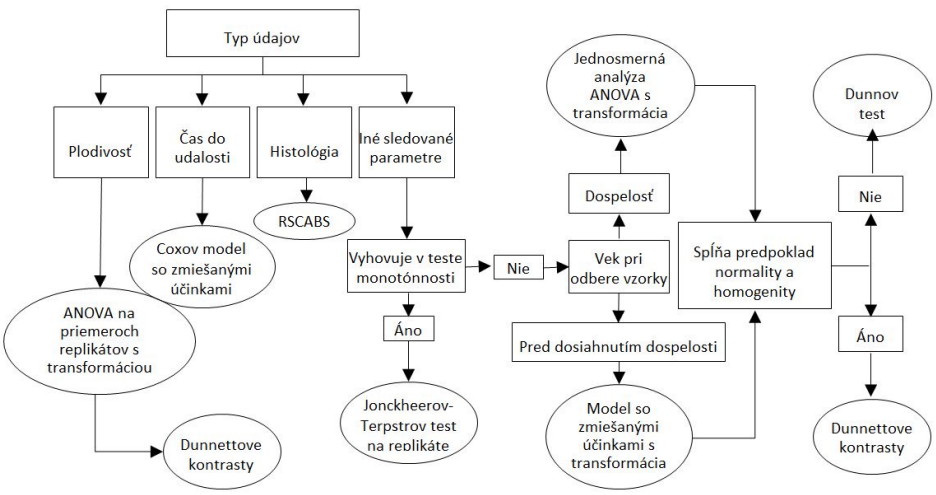
V prípade hmotnosti a dĺžky sa neodporúčajú transformácie, hoci príležitostne môžu byť nevyhnutné. V prípade údajov o vitelogeníne sa však odporúča logaritmická transformácia, v prípade údajov o sekundárnych pohlavných znakoch (papily análnej plutvy) sa odporúča transformácia druhej odmocniny a v prípade údajov o proporciálnom liahnutí, percentuálnej miere prežitia, pomere pohlaví a percentuálnej hodnote oplodnených vajíčok sa odporúča arkussínusová transformácia druhej odmocniny. Čas do vyliahnutia a čas do prvého trenia sa považujú za údaje vyjadrujúce čas do udalosti, pričom na údaje predstavujúce jednotlivé embryá, ktoré sa vo vymedzenom období nevyliahnu, alebo replikáty, pri ktorých nikdy nenastane trenie, sa uplatní cenzurovanie sprava. Čas do vyliahnutia sa vypočíta z mediánu dňa liahnutia jednotlivých replikátov. Tieto sledované parametre sa analyzujú pomocou Coxovho modelu proporcionálnych rizík so zmiešanými účinkami.

V biologických údajoch pochádzajúcich zo vzoriek dospelých jedincov sa nachádza jedno meranie na replikát, t. j. zahŕňajú jednu rybu s chromozómami XX a jednu rybu s chromozómami XY na akvárium s replikátom. Odporúča sa preto, aby sa na stredných hodnotách replikátu uskutočnila jednosmerná analýza ANOVA. Ak sú splnené predpoklady analýzy ANOVA (normalita a homogenita rozptylu na základe posúdenia na rezíduách z analýzy ANOVA pomocou Shapirovho-Wilkovho testu, resp. Levenovho testu), na stanovenie testovaných skupín, ktoré boli odlišné od kontroly, sa majú použiť kontrasty stanovené Dunnettovou metódou. Naopak, ak nie sú splnené predpoklady analýzy ANOVA, na stanovenie testovaných skupín, ktoré boli odlišné od kontroly, sa má použiť Dunnov test. Podobný postup sa odporúča v prípade údajov, ktoré sú v percentuálnej podobe (fertilita, liahnutie a prežitie).

Biologické údaje zo vzoriek jedincov pred dosiahnutím dospelosti obsahujú 1 až 8 meraní na replikát, čo znamená, že môžu zahŕňať premenlivé počty jedincov započítaných do strednej hodnoty replikátu za každé genotypové pohlavie. Preto sa odporúča použitie modelu ANOVA so zmiešanými účinkami a následne použitie kontrastov stanovených Dunnettovou metódou, ak sú splnené predpoklady normality a homogenity rozptylu (na rezíduách modelu ANOVA so zmiešanými účinkami). Ak nie sú splnené, na stanovenie testovaných skupín, ktoré boli odlišné od kontroly, sa má použiť Dunnov test.

Obrázok 2

Vývojový diagram odporúčaných štatistických postupov na analýzu údajov testu MEOGRT



▼**M8**

LITERATÚRA

(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. SKÚŠKA VÝVOJA A RASTU OBOJŽIVELNÍKOV V LARVÁLNOM ŠTÁDIU (LAGDA)

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov 241 (2015). Potreba vytvorenia a validácie skúšky, pomocou ktorej možno identifikovať a charakterizovať nežiaduce dôsledky expozície obojživelníkov toxickým látkam, vychádza z obáv, že úrovne chemikálií v životnom prostredí môžu spôsobovať nežiaduce účinky v prípade ľudí aj voľne žijúcich živočíchov. V usmernení OECD na vykonávanie testov ku skúške vývoja a rastu obojživelníkov v larválnom štádiu (LAGDA) sa opisuje test toxicity v prípade druhu obojživelníka, pri ktorom sa posudzuje rast a vývoj od oplodnenia a počas raného obdobia juvenilného jedinca. V skúške (zvyčajne v trvaní 16 týždňov) sa posudzuje raný vývoj, metamorfóza, prežitie, rast a čiastočné reprodukčné dozrievanie. Pomocou skúšky možno merať aj viacero ďalších sledovaných parametrov umožňujúcich diagnostické hodnotenie chemikálií, pri ktorých existuje podozrenie, že predstavujú endokrinné disruptory (EDC), alebo iných typov vývojovo a reprodukčne toxických látok. Postup opísaný v tejto testovacej metóde je odvodený z validačných činností s použitím africkej pazúrnatky vodnej (*Xenopus laevis*), ktoré vykonala Agentúra Spojených štátov na ochranu životného prostredia (US EPA), s prispením podporných činností vykonaných v Japonsku (1). Hoci v oblasti rastu a vývoja možno testovaciemu protokolu, ktorého dôležitou zložkou je schopnosť stanoviť genetické pohlavie, prispôsobiť iné druhy obojživelníkov, špecifické metódy a sledované parametre z hľadiska pozorovania, ktoré sú opísané v tejto testovacej metóde, sa vzťahujú len na druh *Xenopus laevis*.

2. Skúška LAGDA slúži ako test vyššieho stupňa v prípade obojživelníkov na získanie komplexnejších informácií o nežiaducich účinkoch, pokiaľ ide o závislosť reakcie od koncentrácie, ktoré sú vhodné na použitie na identifikáciu a charakterizáciu nebezpečnosti a na posudzovanie ekologického rizika. Skúška zodpovedá úrovni 4 koncepčného rámca OECD na testovanie a hodnotenie endokrinných disruptorov, v rámci ktorej sa pomocou skúšok *in vivo* získavajú aj údaje o nežiaducich účinkoch na príslušné sledované parametre endokrinného systému (2). V rámci všeobecnej koncepcie pokusu sa uskutoční expozícia embryí *X. laevis* v Nieuwkoopovom a Faberovom (NF) štádiu 8 – 10 (3) najmenej štyrom rôznym koncentráciám testovanej chemikálie (všeobecne s odstupmi nie menšími ako polovica logaritmického intervalu) a kontrolám, a to do 10 týždňov po mediáne času do NF štádia 62 v kontrole, s jednou predbežnou podvzorkou v NF štádiu 62 [(≤ 45 dní po oplodnení; zvyčajne približne 45 dní (dni po oplodnení)]. Pri každej testovanej koncentrácii existujú štyri replikáty, pričom pri kontrole sa používa osem replikátov. Medzi sledované parametre, ktoré sa hodnotia v priebehu expozície (v predbežnej podvzorke a konečnej vzorke pri ukončení testu), patria tie, ktoré signalizujú celkovú toxicitu: mortalitu, abnormálne správanie a parametre stanovenia rastu (dĺžka a hmotnosť), ako aj sledované parametre určené na charakterizovanie špecifických toxických spôsobov účinku na endokrinný systém s pôsobením na fyziologické procesy sprostredkované estrogénom, androgénom alebo štítnou žľazou. V rámci metódy sa kladie hlavný dôraz na potenciálne účinky relevantné z hľadiska populácie (konkrétne škodlivé vplyvy na prežitie, vývoj, rast a reprodukčný vývoj) pri výpočte hodnôt koncentrácie, pri ktorej sa nepozorujú účinky, (NOEC) alebo účinnej koncentrácie, ktorá spôsobuje × % zmenu (ECx) v meranom sledovanom parametri. Je však potrebné poznamenať že prístupy s využitím účinnej koncentrácie ECx sú zriedka vhodné pre rozsiahle štúdie tohto typu, v ktorých môže byť nepraktický rastúci počet testovaných koncentrácií, ktoré majú slúžiť na určenie požadovanej hodnoty ECx. Takisto je potrebné poznamenať, že sa táto metóda nevzťahuje na samotnú reprodukčnú fázu. Vymedzenie pojmov použitých v tejto testovacej metóde sa uvádza v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

3. Vzhľadom na obmedzený počet testovaných chemikálií a laboratórií, ktoré sa zúčastnili na validácii tejto pomerne zložitej štúdie, pričom obzvlášť medzilaboratórna reprodukovateľnosť nebola doposiaľ zdokumentovaná na základe údajov z pokusov, sa predpokladá, že sa usmernenie OECD na vykonávanie

▼M8

testov 241 prehodnotí a v prípade potreby sa zreviduje na základe získaných skúseností, keď bude k dispozícii dostatočný počet štúdií na posúdenie vplyvu novej koncepcie štúdie. LAGDA predstavuje dôležitú skúšku na posúdenie látok, ktoré potenciálne prispievajú k poklesu populácie obojživelníkov, hodnotením účinkov expozície chemikáliám počas citlivého larválneho štádia, keď môžu účinky na prežitie a vývoj vrátane normálneho vývoja reprodukčných orgánov nepriaznivo ovplyvňovať populácie týchto živočíchov.

4. Test je určený na detekciu konečných účinkov v dôsledku endokrinných aj neendokrinných mechanizmov a jeho súčasťou sú diagnostické sledované parametre, ktoré sú sčasti špecifické pre kľúčové endokrinné modality. Je potrebné poznamenať, že pred vyvinutím skúšky LAGDA neexistovala žiadna validovaná skúška, ktorá by slúžila na tento účel v prípade obojživelníkov.

5. Pred začiatkom skúšky je dôležité mať k dispozícii informácie o fyzikálno-chemických vlastnostiach testovanej chemikálie, najmä na to, aby bolo možné pripraviť stabilné chemické roztoky. Je potrebné mať k dispozícii aj primerane citlivú analytickú metódu na overenie koncentrácií testovanej chemikálie. Počas obdobia približne 16 týždňov sa v rámci skúšky celkovo vyžaduje 480 zvierat, t. j. embryí *X. laevis* (alebo 640 embryí v prípade použitia kontroly s aplikáciou rozpúšťadla), aby sa zabezpečila dostatočná kapacita testu na vyhodnotenie sledovaných parametrov súvisiacich s populáciou, napr. rastu, vývoja a reprodukčného dozrievania.

6. Pred použitím tejto testovacej metódy na regulačné testovanie zmesi treba zvážiť, či poskytne prijateľné výsledky na určené regulačné účely. V tejto skúške sa navyše priamo nevyhodnocuje plodivosť, preto sa nemusí dať použiť v pokročilejších fázach, než je úroveň 4 koncepčného rámca OECD na testovanie a hodnotenie endokrinných disruptorov.

VEDECKÝ ZÁKLAD TESTOVACEJ METÓDY

7. Súčasná miera porozumenia biológii obojživelníkov sa do veľkej miery dosiahla prostredníctvom vzorového laboratórneho druhu *X. laevis*. Tento druh možno bežne kultivovať v laboratóriu, ovuláciu možno vyvolať pomocou ľudského chorionického gonadotropínu (hCG) a zásoby zvierat sú jednoducho dostupné od komerčných chovateľov.

8. Podobne ako pri všetkých stavovcoch reprodukciu obojživelníkov riadi os hypotalamus – hypofýza – gonády (HPG) (4). Estrogény a androgény slúžia ako mediátory tohto endokrinného systému a ovplyvňujú vývoj a fyziológiu pohlavne dimorfných tkanív. V životnom cykle obojživelníkov sa vyskytujú tri samostatné fázy, počas ktorých je táto os obzvlášť aktívna: 1. diferenciácia gonád počas larválneho vývoja; 2. vývoj sekundárnych pohlavných znakov a gonadálne dozrievanie počas juvenilnej fázy a 3. funkčná reprodukcia dospelých jedincov. Počas každého z týchto vývojových období sa pravdepodobne prejavuje vnímavosť na narušenie endokrinného systému určitými chemikáliami, ako sú estrogény a androgény, čo v konečnom dôsledku vedie k strate reprodukčnej spôsobilosti organizmov.

9. Vývoj gonád sa začína v NF štádiu 43, keď sa prvýkrát objavuje bipotenciálna gonadálna ryha. Diferenciácia gonád sa začína v NF štádiu 52, keď sa primordiálne zárodočné bunky buď premiestnia do medulárneho tkaniva

▼M8

(samce), alebo zostanú v kortikálnej oblasti (samice) vyvíjajúcich sa gonád (3). Náchylnosť tohto procesu pohlavnej diferenciácie gonád na chemickú zmenu v prípade rodu *Xenopus* sa prvýkrát pozorovala v 50. rokoch dvadsiateho storočia (5) (6). Expozícia žubrienok estradiolu počas tohto obdobia diferenciácie gonád vedie k zmene pohlavia samcov, z ktorých sa pri dosiahnutí dospelosti stávajú úplne funkčné samice (7) (8). Možná je aj funkčná zmena pohlavia samíc na samce, ktorá bola zaznamenaná po implantácii tkaniva semenníkov do žubrienok (9). Aj keď expozícia inhibítoru aromatázy spôsobuje funkčnú zmenu pohlavia aj pri druhu *X. tropicalis* (10), tento jav sa pri druhu *X. laevis* nepreukázal. Historicky sa účinky toxických látok na diferenciáciu gonád posudzovali histologickým vyšetrením gonád pri metamorfóze a zmenu pohlavia bolo možné stanoviť len na základe analýzy pomerov pohlaví. Až donedávna neexistovali prostriedky na priame stanovenie genetického pohlavia rodu *Xenopus*. Stanovením markerov súvisiacich s pohlavím pri druhu *X. laevis* je však v súčasnosti možné určiť genetické pohlavie a priamo identifikovať zvieratá so zmeneným pohlavím (11).

10. Pri samcoch sa v rámci juvenilného vývoja zvyšujú úrovne testosterónu v krvi v súvislosti s vývojom sekundárnych pohlavných znakov a vývojom semenníkov. Pri samiciach sa vo vaječníkoch vytvára estradiol, čo vedie k prítomnosti vitelogenínu (VTG) v plazme, vitelogenínových oocytov vo vaječníku a k vývoju vajcovodov (12). Vajcovody sú samičie sekundárne pohlavné znaky, ktoré sa podieľajú na dozrievaní oocytov počas reprodukcie. Na vonkajší povrch oocytov sa počas prechodu vajcovodom nanáša rôsolovitý povlak a následne sa oocyty, pripravené na oplodnenie, zhromažďujú vo vaku na vajíčka. Vývoj vajcovodov podľa všetkého regulujú estrogény, keďže ich vývoj koreluje s úrovňami estradiolu v krvi pri druhoch *X. laevis* (13) a *X. tropicalis* (12). V prípade samcov sa pozoroval vývoj vajcovodov po expozícii zlúčeninám polychlórovaných bifenylov (14) a 4-*terc*-oktylfenolu (15).

PRINCÍP TESTU

11. V rámci koncepcie testu sa uskutoční expozícia embryí *X. laevis* v NF štádiu 8 – 10 vodnou cestou štyrom rôznym koncentráciám testovanej chemikálie a kontrolám do 10 týždňov po mediáne času do NF štádia 62 v kontrole, s jednou predbežnou podvzorkou v NF štádiu 62. Hoci môže existovať aj možnosť podávania dávok výrazne hydrofóbnych chemikálií prostredníctvom krmiva, v rámci tejto skúšky doteraz existujú len obmedzené skúsenosti s touto expozičnou cestou. Pri každej testovanej koncentrácii existujú štyri replikáty, pričom pri každej použitej kontrole sa používa osem replikátov. Medzi sledované parametre, ktoré sa hodnotia v priebehu expozície, patria tie, ktoré signalizujú celkovú toxicitu [t. j. mortalita, abnormálne správanie a parametre stanovenia rastu (dĺžka a hmotnosť)], ako aj sledované parametre určené na charakterizovanie špecifických toxických spôsobov účinku na endokrinný systém s pôsobením na fyziologické procesy sprostredkované estrogénom, androgénom a štítnou žľazou [t. j. histopatologické vyšetrenie štítnej žľazy, histopatologické vyšetrenie gonád a gonadálneho kanála, abnormálny vývoj, vitelogenín v plazme (voliteľné) a genotypové/fenotypové pomery pohlaví].

KRITÉRIÁ PLATNOSTI TESTU

12. Uplatňujú sa tieto kritériá platnosti testu:

— koncentrácia rozpusteného kyslíka má počas testu dosahovať ≥ 40 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka,

▼**M8**

— teplota vody má byť v rozsahu 21 ±1 °C a rozdiely medzi replikátmi a medzi testovanými skupinami by nemali byť väčšie ako 1,0 °C,

— pH testovaného roztoku sa má udržiavať v rozsahu 6,5 až 8,5 a rozdiely medzi replikátmi a medzi testovanými skupinami by nemali byť väčšie ako 0,5,

— malo by byť preukázateľné, že koncentrácia testovanej chemikálie v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v rozsahu ±20 % stredných nameraných hodnôt,

— mortalita počas obdobia expozície má byť ≤ 20 % pri každom replikáte v kontrolách,

— ≥ 70 % životaschopnosť znášky zvolenej na začiatku štúdie,

— medián času do NF štádia 62 kontrol má byť ≤ 45 dní.

— Priemerná hmotnosť testovaných organizmov v NF štádiu 62 a pri ukončení štúdie v kontrolách a kontrolách s aplikáciou rozpúšťadla (ak sa používajú) má dosiahnuť1,0 ±0,2, resp. 11,5 ±3 g.

13. Odporúča sa, aby boli na analýzu k dispozícii najmenej tri úrovne koncentrácie chemikálie s tromi nenarušenými replikátmi, hoci to nepredstavuje kritérium platnosti. Nadmerná mortalita v rámci testovanej skupiny je vymedzená > 4 úhynmi (< 20 %) najmenej v 2 replikátoch, ktoré nemožno vysvetliť technickou chybou. Na analýzu musia byť k dispozícii aspoň tri úrovne koncentrácie chemikálie bez zjavnej toxicity. Medzi známky zjavnej toxicity môže okrem iného patriť plávanie na povrchu, ležanie na dne nádrže, obrátené alebo nepravidelné plávanie, nevychádzanie na hladinu a nereagovanie na podnety, ako aj morfologické abnormality (napr. deformácie končatín), hemoragické lézie a opuch brucha.

14. Ak sa zistí odchýlka od kritérií platnosti testu, dôsledky by sa mali posudzovať s ohľadom na spoľahlivosť výsledkov testu a tieto odchýlky a úvahy by mali byť zahrnuté do správy o teste.

OPIS METÓD

Prístroje

15. Bežné laboratórne vybavenie a najmä tieto zariadenia:

a) prístroje na reguláciu teploty (napr. ohrievače alebo chladiče nastaviteľné na teplotu 21 ±1 °C);

▼M8

b) teplomer;

c) binokulárny stereoskopický mikroskop a pitevné nástroje;

d) digitálna kamera s rozlíšením aspoň 4 megapixle a s funkciou mikro (v prípade potreby);

e) analytické váhy schopné vážiť na 0,001 mg alebo 1 μg;

f) zariadenia na meranie koncentrácie rozpusteného kyslíka a pH;

g) prístroj na meranie intenzity svetla schopný merať v luxoch.

Voda

Zdroj a kvalita

16. Môže sa použiť akákoľvek voda na riedenie, ktorá je lokálne dostupná (napr. pramenitá voda alebo voda z vodovodu filtrovaná cez uhlie) a umožňuje normálny rast a vývoj druhu *X. laevis*, pričom má byť k dispozícii dôkaz o normálnom raste v danej vode. Keďže kvalita miestnej vody sa môže medzi jednotlivými oblasťami výrazne líšiť, mala by sa vykonať analýza kvality vody, najmä ak nie sú dostupné historické údaje o použiteľnosti vody na chov lariev obojživelníkov. Ak je známe, že voda na riedenie má relatívne stálu kvalitu, stačí, ak sa v nej pred začiatkom testovania a/alebo napríklad raz za šesť mesiacov zmeria obsah ťažkých kovov (napríklad Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavných aniónov a katiónov (napríklad Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), pesticídov, celkový obsah organického uhlíka a nerozpustných pevných látok. Niektoré chemické vlastnosti vody vhodnej na riedenie sú uvedené v dodatku 2.

Koncentrácia jodidu vo vode na testovanie

17. Na to, aby mohla v štítnej žľaze prebiehať syntéza hormónov štítnej žľazy na podporu normálnej metamorfózy, majú mať larvy k dispozícii dostatok jodidu z kombinácie zdrojov vo vode a v potrave. V súčasnosti neexistujú empiricky odvodené usmernenia v súvislosti s minimálnymi koncentráciami jodidu v potrave alebo vo vode na to, aby sa zabezpečil správny vývoj. Dostupnosť jodidu však môže ovplyvniť schopnosť systému štítnej žľazy reagovať na látky pôsobiace v štítnej žľaze a je známe, že jodid reguluje základnú činnosť štítnej žľazy, čo si zasluhuje pozornosť pri interpretácii výsledkov histopatologického vyšetrenia štítnej žľazy. Na základe predchádzajúcich prác sa správna výkonnosť skúšky preukázala v rozsahu koncentrácií jodidu (I^{-}) vo vode na riedenie od 0,5 do 10 μg/l. V ideálnom prípade má byť minimálna koncentrácia jodidu vo vode na riedenie počas celého testu 0,5 μg/l (pridáva sa ako sodná alebo draselná soľ). Ak sa voda na testovanie rekonštituuje z deionizovanej vody, mal by sa pridať jód v minimálnej koncentrácii 0,5 μg/l. Je potrebné uviesť namerané koncentrácie jodidu vo vode na testovanie (t. j. vode na riedenie) a doplnenie jodidu alebo iných solí do vody na testovanie (ak sa použilo). Okrem vody na testovanie možno obsah jodidu merať aj v potrave.

Expozičný systém

18. Test bol navrhnutý pomocou prietokového systému s riedením. Zložky systému, ktoré prichádzajú do kontaktu s vodou, majú byť zo skla, z nehrdzavejúcej ocele a/alebo iných chemicky inertných materiálov. Expozičné nádrže sú akváriá zo skla alebo z nehrdzavejúcej ocele a využiteľný objem nádrže je od 4,0 do 10,0 l (minimálna hĺbka vody 10 až 15 cm). Systém má byť schopný umožniť použitie všetkých expozičných koncentrácií, kontroly a v prípade potreby kontroly s aplikáciou rozpúšťadla, ako aj štyroch replikátov na skupinu s aplikovanou chemikáliou a ôsmich replikátov v kontrolách. Prietok v každej nádrži má byť konštantný, aby bolo možné udržiavať biologické podmienky aj expozíciu chemikálii. Odporúča sa, aby sa použili vhodné prietoky (napr. najmenej 5 výmen obsahu nádrží denne) s cieľom predísť poklesu koncentrácie chemikálie v dôsledku

▼M8

metabolizmu testovaných organizmov aj vodných mikroorganizmov, ktoré sa vyskytujú v akváriách, alebo v dôsledku abiotických ciest degradácie (hydrolýza, fotolýza) alebo disipácie (prchavosť, sorpcia). Testovacie nádrže by sa mali náhodne prideliť na určitú pozíciu v expozičnom systéme, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy pozície vrátane miernych odchýlok v teplote, intenzite svetla atď. Ďalšie informácie o inštalácii prietokových expozičných systémov sa nachádzajú v štandardnom usmernení ASTM na vykonávanie testov akútnej toxicity na testovaných materiáloch pre ryby, makrobezstavovce a obojživelníky (16).

Aplikovanie chemikálie: príprava testovaných roztokov

19. Na prípravu testovaných roztokov v expozičnom systéme sa zásobný roztok testovanej chemikálie dávkuje do expozičného systému pomocou vhodného čerpadla alebo iného zariadenia. Prietok zásobného roztoku sa kalibruje v súlade s analytickým potvrdením testovaných roztokov pred začiatkom expozície a počas testu sa pravidelne kontroluje z hľadiska objemu. Objem testovaného roztoku v každej komore sa obnovuje minimálne päťkrát denne.

20. Metódy používané na aplikovanie testovanej chemikálie do systému sa môžu líšiť v závislosti od jej fyzikálno-chemických vlastností. Preto je pred testom potrebné získať základné informácie o chemikálii relevantné z hľadiska určenia testovateľnosti. Medzi užitočné informácie o špecifických vlastnostiach testovanej chemikálie patrí štruktúrny vzorec, molekulová hmotnosť, čistota, stabilita vo vode a na svetle, hodnoty pK_a a K_{ow}, rozpustnosť vo vode (prednostne v testovacom médiu) a tlak pár, ako aj výsledky testu ľahkej biologickej odbúrateľnosti [testovacia metóda C.4 (17) alebo C.29 (18)]. Rozpustnosť a tlak pár možno použiť na výpočet Henryho konštanty, ktorá bude udávať, či môže dôjsť k stratám v dôsledku vyparovania testovanej chemikálie. Uskutočnenie tohto testu bez vyššie uvedených informácií je potrebné dôkladne zvážiť, keďže koncepcia štúdie je závislá od fyzikálno-chemických vlastností testovanej chemikálie a bez týchto údajov môže byť náročné interpretovať výsledky testu alebo tieto výsledky nemusia byť zmysluplné. Na kvantifikáciu testovanej chemikálie v testovaných roztokoch je potrebné mať spoľahlivú analytickú metódu so známou a uvedenou presnosťou a detekčným limitom. Testované chemikálie rozpustné vo vode možno rozpustiť v alikvotných častiach vody na riedenie v koncentrácii, ktorá umožňuje aplikovanie pri cieľovej testovanej koncentrácii v prietokovom systéme. Pri chemikáliách, ktoré sú kvapalné alebo tuhé pri izbovej teplote a stredne rozpustné vo vode, sa môžu vyžadovať saturačné kolóny typu kvapalina – kvapalina alebo kvapalina – tuhá látka (napríklad kolóna so sklenou vatou) (19). Hoci môže existovať aj možnosť podávania dávok veľmi hydrofóbnych testovaných chemikálií prostredníctvom krmiva, v rámci tejto skúšky existujú len obmedzené skúsenosti s touto expozičnou cestou.

21. Testované roztoky vybraných koncentrácií sa pripravujú riedením zásobného roztoku. Zásobný roztok sa má podľa možnosti pripraviť jednoduchým miešaním alebo pretrepávaním testovanej chemikálie vo vode na riedenie mechanickým prostriedkom (napr. miešadlom a/alebo ultrazvukom). Na dosiahnutie vhodne koncentrovaného zásobného roztoku možno použiť saturačné kolóny/systémy alebo pasívne dávkovacie metódy (20). Uprednostňuje sa použitie testovacieho systému bez kosolventu, rôzne testované chemikálie však budú mať odlišné fyzikálno-chemické vlastnosti, ktoré si pravdepodobne budú vyžadovať rôzne prístupy k príprave vody na expozíciu chemikáliám. Je potrebné vyvinúť všetko úsilie na to, aby sa zabránilo použitiu

▼M8

rozpúšťadiel alebo nosičov, pretože: 1. určité rozpúšťadlá môžu samy osebe spôsobovať toxicitu a/alebo nežiaduce alebo neočakávané reakcie; 2. testovanie chemikálií nad hranicou ich rozpustnosti vo vode (k čomu môže často dôjsť pri použití rozpúšťadiel) môže viesť k nepresnému stanoveniu účinných koncentrácií; 3. použitie rozpúšťadiel v dlhodobejších testoch môže spôsobiť vznik značného stupňa biofilmu v súvislosti s mikrobiálnou aktivitou, ktorý môže mať vplyv na podmienky prostredia, ako aj na schopnosť udržať expozičné koncentrácie; a 4. v prípade, že neexistujú historické údaje, z ktorých vyplýva, že rozpúšťadlo neovplyvňuje výsledok štúdie, pri použití rozpúšťadiel sa vyžaduje použitie kontroly s aplikáciou rozpúšťadla, čo má významné dôsledky z hľadiska dobrých životných podmienok zvierat, keďže sú na uskutočnenie testu potrebné ďalšie zvieratá. V prípade ťažko testovateľných chemikálií možno rozpúšťadlo použiť ako poslednú možnosť, pričom na stanovenie najlepšej metódy je potrebné prečítať si usmerňovací dokument OECD o testovaní toxicity ťažko testovateľných látok a zmesí vo vodnom prostredí (21). Rozpúšťadlo sa vyberie na základe chemických vlastností testovanej chemikálie a dostupnosti historických údajov o kontrolách v súvislosti s rozpúšťadlom. Pokiaľ nie sú dostupné historické údaje, vhodnosť rozpúšťadla sa musí stanoviť pred uskutočnením konečnej štúdie. V prípade, že sa nemožno vyhnúť použitiu rozpúšťadla a vyskytne sa mikrobiálna aktivita (vznik biofilmu), počas celého testu sa odporúča v jednotlivých nádržiach (najmenej raz za týždeň) zaznamenávať vznik biofilmu/podávať správy o jeho vzniku. Koncentrácia rozpúšťadla má byť v ideálnom prípade v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla a vo všetkých testovacích vzorkách konštantná. Ak sa neudržiava konštantná koncentrácia rozpúšťadla, v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla sa má použiť najvyššia koncentrácia rozpúšťadla v testovacej vzorke. V prípadoch, keď sa použije nosič s rozpúšťadlom, nemajú maximálne koncentrácie rozpúšťadla prekročiť 100 µl/l alebo 100 mg/l (21) a odporúča sa udržiavať koncentráciu rozpúšťadla čo najnižšiu (napr. 20 µl/l), aby sa predišlo potenciálnym účinkom rozpúšťadla na merané sledované parametre (22).

Pokusné zvieratá

Testovaný druh

22. Testovaný druh je *X. laevis*, pretože: 1. sa bežne kultivuje v laboratóriách na celom svete; 2. možno ho jednoducho získať prostredníctvom komerčných dodávateľov a 3. umožňuje stanovenie genetického pohlavia.

Párenie dospelých jedincov a starostlivosť o ne

23. Správna starostlivosť o druh *X. laevis* a jeho párenie sa opisuje v štandardizovaných usmerneniach (23). Umiestnenie a starostlivosť o druh *X. laevis* sa opisuje aj v zdroji: Read (24). Na vyvolanie párenia sa trom až piatim párom dospelých samíc a samcov intraperitoneálne vstrekne ľudský chorionický gonadotropín (hCG). Samciam sa vstrekne približne 800 – 1 000 IU a samcom približne 500 – 800 IU hCG rozpusteného v 0,6 – 0,9 % fyziologickom roztoku (alebo Ringerovom roztoku pre žaby, čo je izotonický fyziologický roztok na použitie pri obojživelníkoch). Dávkovaný objem má byť približne 10 µl/g telesnej hmotnosti (~1 000 µl). Páry, pri ktorých sa vyvolalo párenie, sa následne držia vo veľkých nádržiach nerušené a za statických podmienok, aby sa podporil amplexus. Na spodku každej rozmnožovacej nádrže by malo byť falošné dno tvorené sitom z nehrdzavejúcej ocele (napríklad s otvormi s veľkosťou 1,25 cm), ktoré umožňuje padanie vajíčok na spodok nádrže. Žaby, ktorým bol vstreknutý hCG neskoro popoludní, zvyčajne nakladú väčšinu vajíčok do polovice dopoludnia nasledujúceho dňa. Po uvoľnení a oplodnení dostatočného množstva vajíčok je potrebné vybrať dospelé jedince z rozmnožovacích nádrží. Vajíčka sa potom zozbierajú a odstráni sa z nich rôsolovitý povlak ošetrením pomocou L-cysteínu (23). Pripraví sa 2 % roztok L-cysteínu a hodnota pH sa upraví na 8,1 pomocou NaOH s koncentráciou 1 M. Tento roztok s teplotou 21 °C sa pridá do Erlenmeyerovej banky s objemom 500 ml, v ktorej sa nachádzajú

▼M8

vajíčka z jednej znášky, a jemnými krúživými pohybmi sa mieša jednu až dve minúty a potom sa dôkladne premyje 6 až 8 ráz kultivačnou vodou s teplotou 21 °C. Vajíčka sa potom prenesú na kryštalizačnú misku a stanoví sa, či dosahujú > 70 % životaschopnosť s minimálnymi abnormalitami pri embryách, v ktorých dochádza k deleniu buniek.

KONCEPCIA TESTU

Testované koncentrácie

24. Odporúča sa použiť najmenej štyri koncentrácie chemikálie a vhodné kontroly (v prípade potreby vrátane kontrol s aplikáciou rozpúšťadla). Vo všeobecnosti sa odporúča odstup koncentrácií (faktor odstupu), ktorý neprekračuje hodnotu 3,2.

25. Na účely tohto testu sa majú, pokiaľ je to možné, použiť výsledky existujúcich štúdií týkajúcich sa obojživelníkov na stanovenie najvyššej testovanej koncentrácie, aby sa predišlo koncentráciám, ktoré sú zjavne toxické. K stanoveniu takejto koncentrácie môžu prispieť napríklad informácie z kvantitatívnych vzťahov štruktúry a aktivity, prevzatých údajov a údajov z existujúcich štúdií týkajúcich sa obojživelníkov, napríklad zo skúšky metamorfózy obojživelníkov, testovacej metódy C.38 (25) a skúšky teratogenézy žabích embryí – *Xenopus* (23) a/alebo z testov na rybách, napr. testovacích metód C.48, C.41 a C.49 (26) (27) (28). Pred uskutočnením skúšky LAGDA sa môže vykonať pokus na zistenie rozsahu. Odporúča sa, aby sa expozícia na zistenie rozsahu začala do 24 hodín po oplodnení a trvala 7 až 14 dní (alebo v prípade potreby dlhšie) a aby sa testované koncentrácie stanovili tak, že intervaly medzi nimi neprekračujú faktor 10. Výsledky pokusu na zistenie rozsahu slúžia na stanovenie najvyššej testovanej koncentrácie v skúške LAGDA. Ak sa má použiť rozpúšťadlo, možno v rámci štúdie na zistenie rozsahu stanoviť vhodnosť rozpúšťadla (t. j. či môže mať vplyv na výsledok štúdie).

Replikáty v rámci testovaných skupín a kontrol

26. Použiť sa majú najmenej štyri nádrže s replikátom na testovanú koncentráciu a najmenej osem replikátov pre kontroly (a v prípade potreby pre kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla) (t. j. počet replikátov v kontrole a akejkoľvek kontrole s aplikáciou rozpúšťadla má predstavovať dvojnásobok počtu replikátov v každej testovanej skupine, aby sa zabezpečila vhodná štatistická váha). V každom replikáte má byť najviac 20 zvierat. Minimálny počet skúmaných zvierat má byť 15 (5 v podvzorke v NF štádiu 62 a 10 juvenilných jedincov). Do každého replikátu sa však pridávajú ďalšie zvieratá, aby sa zohľadnila možnosť úhynu a zároveň sa zachoval kritický počet 15 jedincov.

POSTUP

Prehľad skúšky

27. Skúška sa začína s novovyprodukovanými embryami (NF štádium 8 – 10) a pokračuje až do obdobia juvenilného vývoja. Pri zvieratách sa denne kontroluje mortalita a akékoľvek príznaky abnormálneho správania. V NF štádiu 62 sa získa podvzorka jedincov v larválnom štádiu (do 5 zvierat na replikát) a skúmajú sa rôzne sledované parametre (tabuľka 1). Keď ako všetky zvieratá dosiahnu NF štádium 66, t. j. dokončila sa metamorfóza (alebo 70 dní od začiatku skúšky, podľa toho, čo nastane skôr), vykoná sa náhodná selekcia (avšak bez odberu podvzoriek), aby sa znížil počet zvierat (10 na nádrž) (pozri odsek 43), a expozícia zvyšných zvierat pokračuje až

▼M8

do 10 týždňov po mediáne času do NF štádia 62 v kontrole. Pri ukončení testu (odber vzoriek juvenilných jedincov) sa uskutočnia dodatočné merania (tabuľka 1).

Podmienky expozície

28. Úplný súhrn parametrov testu sa uvádza v dodatku 3. Počas obdobia expozície je potrebné denne merať koncentráciu rozpusteného kyslíka, teplotu a pH testovaných roztokov. Raz mesačne sa meria vodivosť, alkalita a tvrdosť. Pokiaľ ide o teplotu vody testovaných roztokov, rozdiely medzi replikátmi a medzi testovanými skupinami by (v rámci jedného dňa) nemali byť väčšie ako 1,0 °C. V prípade pH testovaných roztokov nemajú byť rozdiely medzi replikátmi a medzi testovanými skupinami väčšie ako 0,5.

29. Expozičné nádrže sa môžu denne odsávať, aby sa odstránila neskonzumovaná potrava a odpadové produkty, pričom treba postupovať opatrne, aby nedošlo ku krížovej kontaminácii nádrží. Je potrebné minimalizovať stres a traumatizovanie zvierat, obzvlášť počas premiestňovania, čistenia akvárií a manipulácie. Je potrebné vyhýbať sa stresujúcim podmienkam/činnostiam, ako je silný a/alebo nepretržitý hluk, búchanie na akváriá či vibrácie v nádrži.

Dĺžka expozície testovanej chemikálii

30. Expozícia sa začína s novovyprodukovanými embryami (NF štádium 8 – 10) a pokračuje až do 10 týždňov po mediáne času do NF štádia 62 (≤ 45 dní od začiatku skúšky) v kontrolnej skupine. Skúška LAGDA vo všeobecnosti trvá 16 týždňov (maximálne 17 týždňov).

Začiatok skúšky

31. V prípade rodičovských zvierat použitých na začatie skúšky je potrebné preukázať, že už mali potomstvo, pri ktorom bolo možné odlíšiť genetické pohlavie (dodatok 5). Po trení dospelých jedincov sa embryá zozbierajú, ošetria sa cysteínom, aby sa odstránil rôsolovitý povlak, a overí sa ich životaschopnosť (23). Vďaka ošetreniu cysteínom možno počas skríningu manipulovať s embryami bez toho, aby sa prichytávali k povrchom. Skríning sa uskutočňuje pod stereoskopickým mikroskopom, pričom sa pomocou očného kvapkadla vhodnej veľkosti odstránia neživotaschopné embryá. Uprednostňuje sa, aby sa v rámci testu použila jedna znáška so životaschopnosťou vyššou ako 70 %. Embryá v NF štádiu 8 – 10 sa náhodne rozdelia do expozičných testovacích nádrží, ktoré obsahujú vhodný objem vody na riedenie, až kým každá nádrž nebude obsahovať 20 embryí. S embryami sa počas tohto prenosu musí manipulovať opatrne, aby sa minimalizoval stres pri manipulácii a aby nedošlo k poraneniu. 96 hodín po oplodnení by sa žubrienky mali premiestniť nahor vo vodnom stĺpci a začať sa prichytávať k stenám nádrže.

Kŕmny režim

32. Zmeny krmiva a dávky potravy počas rôznych vývojových štádií druhu *X. laevis* predstavujú veľmi dôležitý aspekt protokolu LAGDA. Nadmerné kŕmenie počas larválnej fázy zvyčajne vedie k zvýšenému výskytu a závažnosti skoliózy (dodatok 8) a je potrebné mu predchádzať. Na druhej strane, nedostatočné kŕmenie počas larválnej fázy vedie k veľmi premenlivému tempu vývoja medzi kontrolami, čo môže potenciálne viesť k narušeniu štatistickej váhy alebo zneprehľadneniu výsledkov

▼M8

testu. V dodatku 4 s uvádza odporúčaná potrava a režimy kŕmenia pre druh *X. laevis* v larválnom a juvenilnom štádiu v prietokových podmienkach, prípustné sú však aj alternatívy za predpokladu, že testované organizmy uspokojivo rastú a vyvíjajú sa. Je dôležité poznamenať, že ak sa merajú sledované parametre špecifické pre endokrinný systém, v potrave sa nemajú nachádzať látky s účinkom na endokrinný systém, napríklad sójový šrot.

Kŕmenie lariev

33. Odporúčaná potrava pre larvy obsahuje štartovacie krmivo pre pstruhy, disky z rias *Spirulina* a lupienky potravy pre karasa zlatého (napr. vločky Tetra-Fin®, Tetra, Nemecko) zmiešané v kultivačnej vode (alebo vo vode na riedenie). Táto zmes sa podáva trikrát denne v pracovných dňoch a raz denne počas víkendov. Žubrienky sa kŕmia aj živými 24-hodinovými naupliami žiabronôžky soľnej rodu *Artemia*, a to dvakrát denne počas pracovných dní a raz denne počas víkendov od 8. dňa po oplodnení. Kŕmenie lariev má byť zhodné v jednotlivých testovacích nádobách a má umožňovať primeraný rast a vývoj pokusných zvierat, aby sa zabezpečila reprodukovateľnosť a prenosnosť výsledkov skúšky: 1. medián času do NF štádia 62 v kontrolách má byť ≤ 45 dní a 2. odporúča sa priemerná hmotnosť v rozsahu 1,0 ±0,2 g v NF štádiu 62 v kontrolách.

Kŕmenie juvenilných jedincov

34. Po dokončení metamorfózy sa kŕmny režim skladá z prémiového vodného krmiva pre žaby, napr. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, USA) (dodatok 4). V prípade malých žiab (juvenilných jedincov v ranom štádiu) sa pelety krátko pomelú v mlynčeku na kávu, mixéri alebo sa rozdrvia pomocou trecej misky a paličky, aby sa zmenšila ich veľkosť. Keď juvenilné jedince dosiahnu dostatočnú veľkosť nato, aby mohli konzumovať celé pelety, mletie alebo drvenie už nie je potrebné. Zvieratá sa kŕmia raz denne. Kŕmenie juvenilných jedincov má umožňovať primeraný rast a vývoj organizmov: v prípade kontrolných juvenilných jedincov sa odporúča priemerná hmotnosť v rozsahu 11,5 ±3 g pri ukončení štúdie.

Analytická chémia

35. Pred začatím skúšky by sa mala stanoviť stabilita testovanej chemikálie (napr. rozpustnosť, odbúrateľnosť a prchavosť) a všetky potrebné analytické metódy, napríklad na základe existujúcich informácií a vedomostí. Pri dávkovaní prostredníctvom vody na riedenie sa pred začatím testu odporúča analyzovať testované roztoky z každej nádrže replikátu, aby sa overila výkonnosť systému. Počas obdobia expozície sa koncentrácie testovanej chemikálie stanovujú vo vhodných intervaloch, podľa možnosti každý týždeň najmenej v jednom replikáte v každej testovanej skupine so striedaním medzi replikátmi v tej istej testovanej skupine každý týždeň. Odporúča sa, aby výsledky vychádzali z nameraných koncentrácií. V prípade, že koncentrácia testovanej chemikálie v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v rozsahu ±20 % nominálnej koncentrácie počas celého testu, výsledky môžu vychádzať buď z nominálnych, alebo z nameraných hodnôt. V každej koncentrácii sa má okrem toho počas celého testovacieho obdobia udržiavať variačný koeficient (CV) nameraných testovaných koncentrácií v rámci testovanej skupiny na úrovni 20 % alebo menej. Keď namerané koncentrácie nezostanú v rozsahu 80 až 120 % nominálnej koncentrácie (napr. pri testovaní chemikálií s vysokou mierou biodegradácie alebo adsorpcie), účinná koncentrácia sa má stanoviť a vyjadriť vzhľadom na aritmetický priemer koncentrácie v prietokových testoch.

▼M8

36. Počas trvania expozície sa prietok vody na riedenie a zásobného roztoku kontroluje vo vhodných intervaloch (napr. trikrát týždenne). V prípade chemikálií, ktoré nemožno detegovať pri niektorých alebo pri všetkých nominálnych koncentráciách (napríklad z dôvodu rýchlej degradácie alebo adsorpcie v testovacích nádobách alebo z dôvodu značnej akumulácie chemikálie v telách exponovaných zvierat), sa odporúča, aby sa miera obnovovania testovaného roztoku v každej komore prispôsobila tak, aby sa testované koncentrácie udržiavali čo najkonštantnejšie.

Pozorovania a merania sledovaných parametrov

37. Medzi sledované parametre, ktoré sa hodnotia v priebehu expozície, patria tie, ktoré signalizujú toxicitu vrátane mortality, abnormálneho správania, ako sú klinické príznaky choroby a/alebo všeobecnej toxicity, a parametrov stanovenia rastu (dĺžka a hmotnosť), ako aj sledované parametre z hľadiska patológie, ktoré môžu predstavovať reakciu na spôsoby účinku z hľadiska všeobecnej toxicity a spôsoby účinku na endokrinný systém s pôsobením na dráhy sprostredkované estrogénom, androgénom alebo štítnou žľazou. Navyše sa pri ukončení štúdie môže voliteľne merať koncentrácia VTG v plazme. Meranie VTG môže byť užitočné pri porozumení výsledkom štúdie v kontexte endokrinných mechanizmov pri chemikáliách, pri ktorých existuje podozrenie, že predstavujú endokrinné disruptory (EDC). Sledované parametre a harmonogram meraní sú zhrnuté v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Prehľad sledovaných parametrov v skúške LAGDA

Sledované parametre (*)	Denne	Predbežný odber vzoriek (Odber vzoriek jedincov v larválnom štádiu)	Ukončenie testu (Odber vzoriek juvenilných jedincov)
Mortalita a abnormality	X		
Čas do NF štádia 62		X	
Histo(pato)lógia (štítna žľaza)		X	
Morfometrika (rast z hľadiska hmotnosti a dĺžky)		X	X
Index pomeru hmotnosti pečene k hmotnosti tela (LSI)			X
Genotypové/fenotypové pomery pohlaví			X
Histopatológia (gonády, reprodukčné trubice, oblička a pečeň)			X
Vitelogenín (VTG) (voliteľné)			X

(*) Všetky sledované parametre sa analyzujú štatisticky.

Mortalita a denné pozorovania

38. Všetky testovacie nádrže sa musia každý deň kontrolovať, či v nich nie sú zvieratá, pričom v každej nádrži sa zaznamenáva uhynuté mortalita. Mŕtve zvieratá sa musia z nádrže odstrániť ihneď po zistení úhynu. Vývojové štádium uhynutých zvierat sa kategorizuje ako NF štádium skoršie ako 58 (pred vyvinutím predných končatín), NF štádium 58 – NF štádium 62, NF štádium 63 – NF štádium 66 (od NF štádia 62 po úplnú absorpciu chvosta) a obdobie po NF štádiu 66 (ukončené larválne štádium). Mortalita presahujúca 20 % môže znamenať nevhodné testovacie podmienky alebo zjavne toxické účinky testovanej chemikálie. Zvieratá sú zvyčajne najviac citlivé z hľadiska mortality, ktorá nie je vyvolaná chemikáliami, počas prvých dní vývoja po trení a počas vrcholu metamorfózy. Takáto mortalita môže byť zrejmá z kontrolných údajov.

▼**M8**

39. Okrem toho je potrebné zaznamenať akékoľvek známky abnormálneho správania, zreteľne viditeľné malformácie (napr. skolióza) alebo lézie. Pozorované výskyty skoliózy je potrebné spočítať (incidencia) a ohodnotiť z hľadiska závažnosti (napr. nepozorovaná – NR, minimálna – 1, mierna – 2, závažná – 3; dodatok 8). Je potrebné usilovať sa o to, aby sa v rámci celej štúdie obmedzila prevalencia miernej a závažnej skoliózy (napr. menej ako 10 % v kontrolách), hoci vyššia prevalencia abnormalít v kontrolách nemusí byť nevyhnutne dôvodom na ukončenie testu. Normálne správanie jedincov v larválnom štádiu je charakterizované rozptýlením vo vodnom stĺpci s chvostom vztýčeným nad hlavou, pravidelným rytmickým pohybom chvostovou plutvou, pravidelným vychádzaním na hladinu, vytvorením žiabrových viečok a reagovaním na podnety. Abnormálne správanie zahŕňa napríklad plávanie na povrchu, ležanie na dne nádrže, obrátené alebo nepravidelné plávanie, nevychádzanie na hladinu a nereagovanie na podnety. V prípade zvierat, pri ktorých prebehla metamorfóza, sa okrem takéhoto abnormálneho správania majú zaznamenať aj výrazné rozdiely v príjme potravy. Zreteľné malformácie a lézie môžu okrem iného zahŕňať morfologické abnormality (napr. deformácie končatín), hemoragické lézie, opuch brucha a bakteriálne alebo plesňové infekcie. Výskyt lézií na hlave juvenilných jedincov bezprostredne za nozdrami môže naznačovať nedostatočnú úroveň vlhkosti. Tieto stanovenia sú kvalitatívne a mali by sa považovať za podobné klinickým príznakom ochorenia/stresu a porovnať s kontrolnými zvieratami. Ak je miera výskytu v exponovaných nádržiach vyššia ako v kontrolných nádržiach, malo by sa to považovať za dôkaz zjavnej toxicity.

Odber podvzoriek jedincov v larválnom štádiu

Prehľad odberu podvzoriek jedincov v larválnom štádiu:

40. Žubrienky, ktoré dosiahli NF štádium 62, sa vyberú z nádrží a buď sa z nich odoberú vzorky, alebo sa presunú do nasledujúcej časti expozície v novej nádrži, prípadne sa fyzicky oddelia od zvyšných žubrienok v rovnakej nádrži pomocou oddeľovača. Denne sa vykonáva kontrola žubrienok a zaznamená sa deň štúdie, v ktorom jednotlivá žubrienka dosiahla NF štádium 62. Určujúcou charakteristikou, ktorá sa použije pri tomto posúdení, je tvar hlavy. Keď sa veľkosť hlavy zmenší tak, že má na pohľad približne rovnakú šírku ako trup žubrienky, a predné končatiny sa nachádzajú na úrovni stredu srdca, pri danom jedincovi sa zaznamená dosiahnutie NF štádia 62.

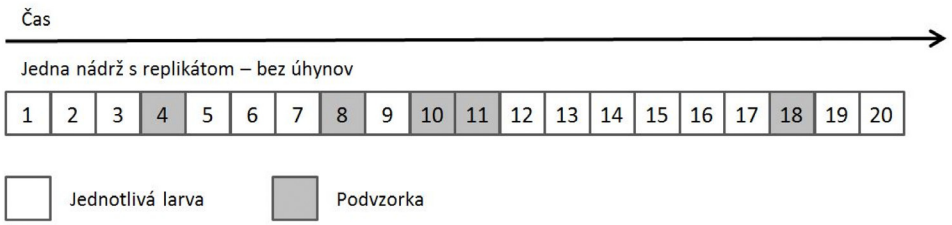
41. Cieľom je odobrať vzorku obsahujúcu celkovo päť žubrienok v NF štádiu 62 na nádrž s replikátom. Postupuje sa pri tom celkom náhodne, rozhodnutie je však potrebné uskutočniť *a priori*. Hypotetický príklad nádrže s replikátom je uvedený na **obrázku 1**. Ak sa v čase, keď prvý jedinec dosiahne NF štádium 62, v príslušnej nádrži nachádza 20 žubrienok, ktoré prežili, vyberie sa päť náhodných čísel z rozsahu 1 – 20. Žubrienka č. 1 je prvý jedinec, ktorý dosiahol NF štádium 62, a žubrienka č. 20 je posledný jedinec v nádrži, ktorý dosiahol NF štádium 62. Podobne, ak je v príslušnej nádrži 18 žubrienok, ktoré prežili, vyberie sa päť náhodných čísel z rozsahu 1 – 18. Tento postup sa uskutoční v každej nádrži s replikátom, keď prvý jedinec v teste dosiahne NF štádium 62. Ak počas odberu vzoriek v NF štádiu 62 dôjde k úhynom, zvyšné vzorky je potrené opätovne randomizovať na základe počtu zostávajúcich lariev, ktoré ešte nedosiahli NF štádium 62, a na základe toho, koľko ďalších vzoriek je potrebných, aby sa dosiahlo celkovo päť vzoriek z daného replikátu. V deň, keď žubrienka dosiahne NF štádium 62, sa na základe pripravenej schémy na odber vzoriek stanoví, či sa

▼M8

daný jedinec vyberie do vzorky alebo či sa fyzicky oddelí od zvyšných žubrienok na účely pokračovania expozície. V uvedenom príklade (obrázok 1) sa prvý jedinec, ktorý dosiahne NF štádium 62 (t. j. políčko č. 1), fyzicky oddelí od ostatných lariev a pokračuje jeho expozícia, pritom sa zaznamená deň štúdie, v ktorom tento jedinec dosiahol NF štádium 62. Následne sa pri jedincoch č. 2 a č. 3 postupuje rovnako ako v prípade jedinca č. 1 a potom sa jedinec č. 4 vyberie do vzorky na posúdenie rastu a histológie štítnej žľazy (podľa tohto príkladu). V tomto postupe sa pokračuje, až kým sa nedospeje k 20. jedincovi, ktorý sa buď zaradí k ostatným jedincom po NF štádiu 62, alebo sa vyberie do vzorky. Musí sa použiť taký náhodný postup, aby bola pri každom testovanom organizme rovnaká pravdepodobnosť, že bude vybratý. To možno dosiahnuť použitím akejkoľvek randomizačnej metódy, ale vyžaduje sa, aby sa každá žubrienka vybrala sieťkou v určitom bode počas obdobia odberu podvzoriek v NF štádiu 62.

Obrázok 1

Hypotetický príklad režimu odberu vzoriek v NF štádiu 62 pre jednu nádrž s replikátom



42. Pri odbere podvzoriek jedincov v larválnom štádiu sa získavajú tieto sledované parametre: 1. čas do NF štádia 62 (t. j. počet dní od oplodnenia po dosiahnutie NF štádia 62); 2. vonkajšie abnormality; 3. morfometrika (napr. hmotnosť a dĺžka) a 4. histológia štítnej žľazy.

Humánne usmrcovanie žubrienok

43. Podvzorka žubrienok v NF štádiu 62 (5 jedincov na replikát) sa usmrtí ponorením na 30 minút do vhodného množstva (napr. 500 ml) anestetického roztoku (napr. 0,3 % roztok MS-222, trikaín metán sulfonát, CAS 886-86-2). Roztok MS-222 sa tlmí pridaním bikarbonátu sodného na hodnotu pH približne 7,0, pretože netlmený roztok MS-222 je kyslý a dráždi kožu žiab, čo vedie k nedostatočnej absorpcii a nežiaducemu dodatočnému stresu, ktorému sú organizmy vystavené.

44. Pomocou ponornej sieťky sa žubrienka vyberie z pokusnej komory a prenesie sa (umiestni sa) do usmrcovacieho roztoku. Zviera je riadne usmrtené a pripravené na pitvu, keď nereaguje na externé stimuly, napríklad zovretie zadnej končatiny pomocou pinzety.

Morfometrika (hmotnosť a dĺžka)

45. Meranie vlhkej hmotnosti (s presnosťou na mg) a dĺžky od pysku po kloaku (SVL) (s presnosťou na 0,1 mm) pri každej žubrienke sa uskutočňuje hneď po tom, ako žubrienka prestane reagovať v dôsledku anestézie (obrázok 2a). Na meranie SVL z fotografie možno použiť softvér na obrazovú analýzu. Žubrienky možno pred vážením osušiť, aby

▼M8

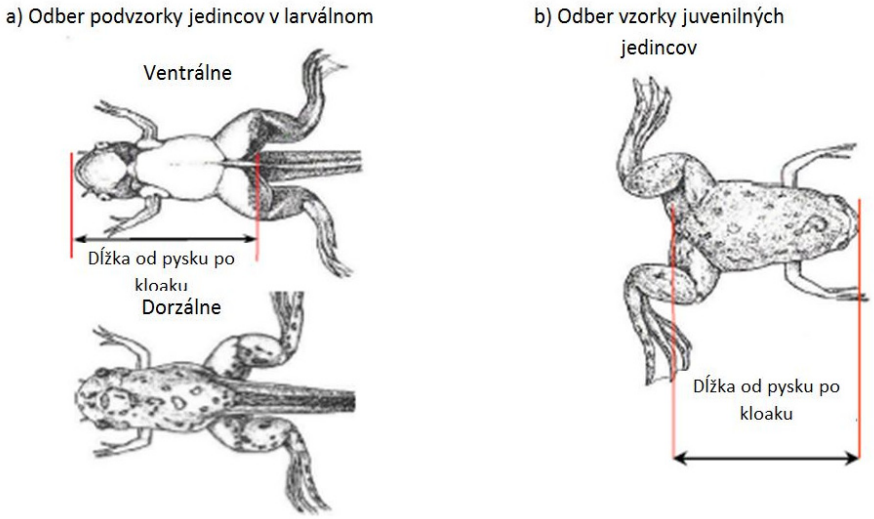
sa z nich odstránila prebytočná voda. Po uskutočnení meraní veľkosti tela (hmotnosť a SVL) sa zaznamenajú alebo zapíšu zreteľné morfologické abnormality a/alebo klinické príznaky toxicity, napríklad skolióza (pozri dodatok 8), petechie a hemorágia, pričom sa odporúča vytvorenie digitálnej dokumentácie. Petechie sú malé červené alebo fialové krvné výrony v kožných kapilárach.

Odber a fixácia tkaniva

46. V prípade podvzorky jedincov v larválnom štádiu sa posudzujú štítne žľazy z hľadiska histológie. Spodná časť trupu za prednými končatinami sa odstráni a vyradí. Zvyšok tela zvieraťa sa zafixuje v Davidsonovom fixačnom prostriedku. Objem fixačného prostriedku v nádobe má predstavovať najmenej desaťnásobok približného objemu tkaniva. Na správnu fixáciu tkanív, ktoré sú predmetom záujmu, je potrebné zabezpečiť vhodné miešanie alebo cirkuláciu fixačného prostriedku. Všetky tkanivá zostávajú v Davidsonovom fixačnom prostriedku najmenej 48 hodín, nie však viac ako 96 hodín. Potom sa opláchnu deionizovanou vodou a uskladnia sa v 10 % neutrálnom tlmenom formalíne (1) (29).

Histológia štítnej žľazy

47. V prípade každej podvzorky jedincov v larválnom štádiu (zafixované tkanivá) sa vykoná histologické posúdenie štítnej žľazy, čo zahŕňa diagnostiku a hodnotenie závažnosti (29) (30).



Obrázok 2: Znaky na meranie dĺžky od pysku po kloaku pri skúške LAGDA pri jedincoch v NF štádiu 62 (a) a juvenilných žabách (b). Určujúce charakteristiky NF štádia 62 (a): hlava má rovnakú šírku ako trup, čuchový nerv je kratší ako priemer čuchového bulbu (dorzálny pohľad) a predné končatiny sú na úrovni srdca (ventrálny pohľad). Obrázky upravené zo zdroja Nieuwkoop a Faber (1994).

Koniec larválnej expozície

48. Vzhľadom na počiatočný počet žubrienok sa očakáva, že medzi nimi pravdepodobne bude malý percentuálny podiel jedincov, ktoré sa nebudú normálne vyvíjať a v primeranom čase sa pri nich nedokončí metamorfóza (NF štádium 66). Larválne obdobie expozície nemá prekročiť 70 dní. Všetky

▼M8

žubrienky, ktoré zostanú na konci tohto obdobia, sa usmrtia (pozri odsek 43), odmeria sa ich vlhká hmotnosť a SVL, priradí sa im štádium podľa Nieuwkoopa a Fabera (1994) a zaznamenajú sa akékoľvek vývojové abnormality.

Selekcia po NF štádiu 66

49. Od NF štádia 66 (úplná resorpcia chvosta) sa pokračuje s desiatimi jedincami na nádrž až do ukončenia expozície. Po tom, ako všetky zvieratá dosiahnu NF štádium 66, alebo po 70 dňoch (podľa toho, čo nastane skôr) sa preto musí uskutočniť selekcia. Náhodne sa vyberú zvieratá po NF štádiu 66, pri ktorých sa nebude pokračovať v expozícii.

50. Zvieratá, ktoré sa nevyberú na účely pokračovania expozície, sa usmrtia (pozri odsek 43). Pri každom zvierati sa uskutočnia merania vývojového štádia, vlhkej hmotnosti a SVL (obrázok 2b), ako aj makroskopická pitva. Fenotypové pohlavie (na základe morfológie gonád) sa zaznamená ako samičie, samčie alebo neurčité.

Odber vzoriek juvenilných jedincov

Prehľad odberu vzoriek juvenilných jedincov

51. Expozícia zvyšných zvierat pokračuje až do dosiahnutia 10 týždňov po mediáne času do NF štádia 62 v kontrole s vodou na riedenie (a/alebo v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla, ak je to relevantné). Na konci obdobia expozície sa zvyšné zvieratá (najviac 10 žiab na replikát) usmrtia a zmerajú/posúdia a zaznamenajú sa rôzne sledované parametre: 1. morfometrika (hmotnosť a dĺžka); 2. fenotypové/genotypové pomery pohlaví; 3. hmotnosť pečene (index pomeru hmotnosti pečene k hmotnosti tela); 4. histopatológia (gonády, reprodukčné trubice, oblička a pečeň) a voliteľne 5. VTG v plazme.

Humánne usmrcovanie žiab

52. Juvenilné žaby po uskutočnení metamorfózy sa usmrtia intraperitoneálnou injekciou anestetika, napr. 10 % MS-222 vo vhodnom fosfátovom tlmivom roztoku. Vzorky zo žiab sa môžu odobrať po tom, ako žaby prestanú reagovať (zvyčajne približne 2 minúty po injekčnom podaní, ak sa použije 10 % MS-222 s dávkovaním 0,01 ml na gram žaby). Hoci možno juvenilné žaby ponoriť do anestetika s vyššou koncentráciou (MS-222), zo skúseností vyplýva, že dosiahnutie anestézie trvá pomocou tejto metódy dlhšie a jej trvanie nemusí byť dostatočné na to, aby bolo možné odobrať vzorky. Injekčným podaním sa dosahuje účinné a rýchle usmrtenie pred odberom vzoriek. K odberu vzoriek sa pristúpi až vtedy, keď sa na základe absencie reakcií na podnety potvrdí, že žaby sú mŕtve. Ak sa na žabách prejavujú príznaky značného utrpenia (vo veľmi závažnej miere a je možné spoľahlivo predpokladať smrť) a zvieratá sa považujú za moribundné, je potrebné im podať anestetikum a usmrtiť ich a na účely analýzy údajov ich považovať za uhynuté. Ak sa žaba usmrtí v dôsledku morbidity, zaznamená sa to a uvedie v správe. Žaba sa môže uchovať na účely histopatologickej analýzy (fixácia žaby na účely možnej histopatológie) v závislosti od toho, kedy počas štúdie dôjde k jej usmrteniu.

Morfometrika (hmotnosť a dĺžka)

53. Merania vlhkej hmotnosti a SVL (obrázok 2b) sú totožné s meraniami uvedenými pre odber podvzoriek jedincov v larválnom štádiu.

▼M8

VTG v plazme (voliteľné)

54. VTG je všeobecne akceptovaný biologický marker vyskytujúci sa v dôsledku expozície estrogénovým chemikáliám. Pri skúške LAGDA sa VTG v plazme môže voliteľne merať v prípade vzoriek z juvenilných zvierat (obzvlášť relevantné to môže byť v prípade podozrenia, že testovaná chemikália má estrogénové pôsobenie).

55. Zadné končatiny usmrteného juvenilného jedinca sa narežú a krv sa odoberie pomocou heparinizovanej kapiláry (vhodné však môžu byť aj alternatívne metódy odberu krvi, napríklad punkcia srdca). Krv sa vytlačí do skúmavky mikroodstredivky (napr. s objemom 1,5 ml) a odstreďovaním sa z nej získa plazma. Vzorky plazmy sa skladujú pri teplote –70 °C alebo nižšej až do stanovenia VTG. Koncentráciu VTG v plazme možno merať pomocou metódy enzýmového imunosorbentového stanovenia (ELISA) (dodatok 6) alebo pomocou alternatívnej metódy, napr. hmotnostnej spektrometrie (31). Kvôli vyššej citlivosti sa uprednostňujú druhovo špecifické protilátky.

Určenie genetického pohlavia

56. Genetické pohlavie každej juvenilnej žaby sa určuje na základe markerov, ktoré vyvinul Yoshimoto a kol. (11). Na účely určenia genetického pohlavia sa odoberie časť jednej zadnej končatiny (alebo celá zadná končatina), ktorá sa odstránila počas pitvy, a vloží sa do skúmavky mikroodstredivky (vzorky tkaniva zo žiab možno získať z akéhokoľvek tkaniva). Tkanivo možno skladovať pri teplote –20 °C alebo nižšej až do izolácie deoxyribonukleovej kyseliny (DNA). Na izoláciu DNA z tkanív možno použiť komerčne dostupné súpravy a analýza na stanovenie prítomnosti alebo neprítomnosti markera sa uskutočňuje metódou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) (dodatok 5). Súlad medzi histologicky zisteným pohlavím a genotypom medzi kontrolnými zvieratami v čase odberu vzoriek juvenilných jedincov v kontrolných skupinách je viac ako 95 %.

Odber a fixácia tkaniva na účely histopatológie

57. Počas konečného odberu vzoriek sa odoberú gonády, reprodukčné trubice, obličky a pečene na účely histologickej analýzy. Otvorí sa brušná dutina a pečeň sa oddelí rezom a odváži. Z dolnej časti brucha sa ďalej opatrne odstránia orgány tráviacej sústavy (napr. žalúdok, črevá), aby sa získal prístup ku gonádam, k obličkám a reprodukčným trubiciam. Zaznamenajú sa zreteľné morfologické abnormality v gonádach. Nakoniec sa odstránia zadné končatiny, ak sa už neodstránili skôr pri odbere krvi. Odobraté pečene a telo s gonádami ponechanými *in situ* sa okamžite vložia do Davidsonovho fixačného prostriedku. Objem fixačného prostriedku v nádobe má predstavovať najmenej desaťnásobok približného objemu tkaniva. Všetky tkanivá zostávajú v Davidsonovom fixačnom prostriedku najmenej 48 hodín, nie však viac ako 96 hodín. Potom sa opláchnu deionizovanou vodou a uskladnia sa v 10 % neutrálnom tlmenom formalíne (1) (29).

Histopatológia

58. Každá juvenilná vzorka sa histologicky posudzuje z hľadiska výskytu patologických javov v gonádach, reprodukčných trubiciach, obličkách a tkanive pečene, čo zahŕňa diagnostiku a hodnotenie závažnosti (32). Od tohto posúdenia sa odvodzuje aj gonádový fenotyp (napr. vaječníky, semenníky, intersexuálny jedinec) a spolu s jednotlivými meraniami genetického pohlavia možno na základe týchto pozorovaní vypočítať fenotypové/genotypové pomery pohlaví.

▼M8

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Štatistická analýza

59. V rámci skúšky LAGDA sa vytvárajú tri druhy údajov, ktoré sa majú štatisticky analyzovať: 1. kvantitatívne spojité údaje (hmotnosť, SVL, LSI, VTG); 2. údaje vyjadrujúce čas do udalosti z hľadiska tempa vývoja (t. j. počet dní do NF štádia 62 od začiatku skúšky) a 3. poradové údaje v podobe skóre závažnosti alebo vývojových štádií z histopatologických hodnotení.

60. Odporúča sa, aby koncepcia testu a výber štatistických testov poskytovali dostatočnú váhu na detekciu zmien biologického významu v sledovaných parametroch, pri ktorých sa má uvádzať hodnota NOEC alebo ECx. Pri štatistických analýzach údajov (vo všeobecnosti na základe priemeru replikátov) by sa podľa možnosti malo vychádzať z postupov uvedených v dokumente Súčasné prístupy k štatistickej analýze údajov o ekotoxicite: usmernenie k uplatňovaniu (33). V dodatku 7 k tejto testovacej metóde je k dispozícii odporúčaná schéma rozhodovania z hľadiska štatistickej analýzy a usmernenie s cieľom pomôcť pri spracovaní údajov a pri výbere najvhodnejšieho štatistického testu alebo modelu, ktorý sa použije pri skúške LAGDA.

61. Údaje z odberu vzoriek juvenilných jedincov (napr. rast, LSI) sa analyzujú samostatne pre každé genotypové pohlavie, keďže genotypové pohlavie sa určuje pri všetkých žabách.

Úvahy v súvislosti s analýzou údajov

Používanie narušených replikátov a testovaných skupín

62. K narušeniu replikátov a testovaných skupín môže dôjsť v dôsledku abnormálnej mortality spôsobenej zjavnou toxicitou, ochorením alebo technickou chybou. Ak dôjde k narušeniu testovanej skupiny v dôsledku choroby alebo technickej chyby, na analýzu majú byť k dispozícii tri nenarušené testované skupiny s tromi nenarušenými replikátmi. Ak sa zjavná toxicita vyskytuje pri testovaných skupinách s vysokou dávkou, uprednostňuje sa, aby boli na účely analýzy k dispozícii aspoň tri úrovne koncentrácie chemikálie s tromi nenarušenými replikátmi [v súlade s prístupom na základe maximálnej tolerovanej koncentrácie pri usmerneniach OECD na vykonávanie testov (34)]. Okrem úhynu môžu medzi známky zjavnej toxicity patriť účinky na správanie (napr. plávanie na povrchu, ležanie na dne nádrže, obrátené alebo nepravidelné plávanie, nevychádzanie na hladinu), morfologické lézie (napr. hemoragické lézie, opuch brucha) alebo inhibícia normálnych reakcií na kŕmenie pri kvalitatívnom porovnaní s kontrolnými zvieratami.

Kontrola s rozpúšťadlom

63. Po skončení testu by sa malo vykonať hodnotenie potenciálnych vplyvov rozpúšťadla (ak sa použilo). To sa dosiahne štatistickým porovnaním kontrolnej skupiny s aplikáciou rozpúšťadla a kontrolnej skupiny s vodou na riedenie. Medzi najrelevantnejšie sledované parametre na posúdenie v rámci tejto analýzy patria faktory rastu (hmotnosť a dĺžka), keďže na ne môžu mať vplyv celkové toxicity. Ak sa zistia štatisticky významné rozdiely v týchto sledovaných parametroch medzi kontrolnou skupinou s vodou na riedenie a kontrolnou skupinou s aplikáciou rozpúšťadla, je potrebné na základe najlepšieho odborného úsudku určiť, či nedošlo k narušeniu platnosti testu. Ak sa tieto dve kontroly líšia, testované skupiny vystavené chemikálii sa majú porovnať s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla, pokiaľ nie je známe, že sa uprednostňuje porovnanie s kontrolou s vodou na riedenie. Ak neexistuje štatisticky významný rozdiel medzi týmito dvomi kontrolnými skupinami, odporúča sa, aby sa testované skupiny vystavené testovanej chemikálii porovnali so zoskupenými kontrolami (kontrolné skupiny s aplikáciou rozpúšťadla a s vodou na riedenie), pokiaľ nie je známe, že sa uprednostňuje porovnanie buď len s kontrolnou skupinou s vodou na riedenie, alebo len s kontrolnou skupinou s aplikáciou rozpúšťadla.

▼M8

Správa o teste

64. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

— Jednozložkové látky:

fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď. (vrátane obsahu organického uhlíka, ak to je vhodné).

— Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Testovaný druh:

— vedecký názov, kmeň, ak je dostupný, zdroj a metóda zberu oplodnených vajíčok a následnej manipulácie.

— Výskyt skoliózy v historických kontrolách pri použitej zásobnej kultúre.

Podmienky testu:

— fotoperiódy,

— koncepcia testu (napr. veľkosť a materiál komory a objem vody, počet testovacích komôr a replikátov, počet testovaných organizmov na replikát),

— metóda prípravy zásobných roztokov a frekvencia obnovy (ak bol použitý solubilizačný prostriedok, mal by sa uviesť spolu s jeho koncentráciou),

— metóda dávkovania testovanej chemikálie (napr. čerpadlá, riediace systémy),

— miera výťažnosti metódy a nominálne testované koncentrácie, kvantifikačný limit, priemery nameraných hodnôt a ich štandardné odchýlky v testovacích nádobách a metóda, ktorou boli dosiahnuté, a dôkaz, že sa namerané hodnoty týkajú koncentrácií testovanej chemikálie v skutočnom roztoku,

— vlastnosti vody na riedenie: pH, tvrdosť vody, teplota, koncentrácia rozpusteného kyslíka, úrovne zvyškového chlóru (ak boli merané), celkový obsah jódu, celkový obsah organického uhlíka (ak bol meraný), nerozpustené pevné látky (ak boli merané), salinita v testovacom médiu (ak bola meraná) a akékoľvek iné vykonané merania,

— nominálne testované koncentrácie, priemery nameraných hodnôt a ich štandardné odchýlky,

— kvalita vody v testovacích nádobách: pH, teplota (meraná denne) a koncentrácia rozpustného kyslíka,

▼**M8**

— podrobné informácie o kŕmení (napr. druh potravy, zdroj, dávkované množstvo a frekvencia).

Výsledky:

— dôkaz, že kontroly splnili kritériá validity,

— tieto údaje pre kontrolu (plus kontrolu s aplikáciou rozpúšťa, ak sa použila) a testované skupiny: pozorovaná mortalita a abnormality, čas do NF štádia 62, posúdenie histológie štítnej žľazy (len vzorka v larválnom štádiu), rast (hmotnosť a dĺžka), LSI (len juvenilná vzorka), pomery genetických/fenotypových pohlaví (len juvenilná vzorka), výsledky histopatologického posúdenia gonád, reprodukčných trubíc, obličky a pečene (len juvenilná vzorka) a VTG v plazme (len juvenilná vzorka, ak sa skúmalo),

— prístup uplatnený pri štatistickej analýze a spracovaní údajov (použitý štatistický test alebo model),

— koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC) pre každú posudzovanú reakciu,

— najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC) (pri $\alpha = 0,05$) pre každú posudzovanú reakciu; v prípade potreby hodnota ECx pre každú posudzovanú reakciu vrátane intervalov spoľahlivosti (napr. 95 %) a grafu zavedeného modelu použitého na jej výpočet, sklon krivky závislosti veličiny od koncentrácie, vzorec regresného modelu, odhadované parametre modelu a ich štandardné chyby,

— akákoľvek odchýlka od testovacej metódy a odchýlky od kritérií prijateľnosti a úvahy o možných dôsledkoch v súvislosti s výsledkom testu.

65. V prípade výsledkov merania sledovaných parametrov sa uvádzajú priemerné hodnoty a ich štandardné odchýlky (na základe replikátov aj koncentrácií, ak je to možné).

66. Vypočíta sa medián času do NF štádia 62 v kontrolách, ktorý sa uvádza ako stredná hodnota mediánov replikátov a ich štandardnej odchýlky. Podobne sa v prípade testovaných skupín vypočíta medián testovanej skupiny, ktorý sa uvádza ako stredná hodnota mediánov replikátov a ich štandardnej odchýlky.

LITERATÚRA

(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) Kapitola C.4 tejto prílohy, Test ľahkej biodegradovateľnosti.

(18) Kapitola C.29 tejto prílohy, Ľahká biodegradovateľnosť – CO_2 v hermeticky uzavretých nádobách (test v uzavretom priestore nad kvapalinou).

(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., s. 84

(25) Kapitola C.38 tejto prílohy, Skúška metamorfózy obojživelníkov.

(26) Kapitola C.48 tejto prílohy, Krátkodobý reprodukčný test na rybách.

(27) Kapitola C.41 tejto prílohy, Test pohlavného vývinu rýb.

(28) Kapitola C.49 tejto prílohy, Test akútnej toxicity na rybích embryách (FET).

(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

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Koncový sledovaný parameter: účinok pôsobiaci na úrovni populácie.

Chemikália: látka alebo zmes.

ELISA: enzýmové imunosorbentové stanovenie

ECx: (účinná koncentrácia pre x % účinok) je koncentrácia, ktorá počas daného obdobia expozície vyvolá x % účinok na testované organizmy v porovnaní s kontrolnou skupinou. Napríklad EC50 je koncentrácia, pri ktorej sa odhaduje, že počas vymedzeného obdobia expozície vyvolá účinok na sledovaný ukazovateľ testu v 50 % exponovanej populácie.

dpf: dni po oplodnení

Prietokový test: test s neustálym prietokom testovaných roztokov cez testovací systém počas trvania expozície.

Os HPG: os hypotalamus – hypofýza – gonády

IUPAC: Medzinárodná únia pre čistú a aplikovanú chémiu.

Najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC): je najnižšia testovaná koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej je účinok chemikálie štatisticky významný (pri $p < 0,05$) v porovnaní s kontrolou. Škodlivý účinok všetkých testovaných koncentrácií vyšších ako hodnota LOEC by však mal byť rovnaký alebo väčší ako účinky pozorované pri hodnote LOEC. Ak nie sú splnené tieto dve podmienky, je potrebné poskytnúť úplné vysvetlenie, akým spôsobom sa zvolila hodnota LOEC (a teda aj NOEC). Usmernenie sa uvádza v dodatku 7.

Stredná letálna koncentrácia (LC50): predstavuje koncentráciu testovanej chemikálie, ktorá sa odhadne ako letálna pre 50 % testovaných organizmov počas trvania testu.

Koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC): je testovaná koncentrácia chemikálie ihneď pod LOEC, ktorá pri porovnaní s kontrolou nemá štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) počas daného obdobia expozície.

SMILES: zjednodušený systém zadávania molekulárnych štruktúr.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

VTG: vitelogenín. Je to fosfolipoglykoproteín, slúžiaci ako prekurzor proteínov vaječného žĺtka, ktorý sa normálne vyskytuje v telách pohlavne aktívnych samíc všetkých vajcorodých druhov.

▼**M8**

Dodatok 2

NIEKTORÉ CHEMICKÉ VLASTNOSTI VODY VHODNEJ NA RIEDENIE

Látka	Koncentračný limit
Tuhé častice	5 mg/l
Celkový obsah organického uhlíka	2 mg/l
Neionizovaný amoniak	1 µg/l
Zvyškový chlór	10 µg/l
Celkový obsah organofosforových pesticídov	50 ng/l
Celkový obsah organochlórových pesticídov a polychlórovaných bifenylov	50 ng/l
Celkový obsah organického chlóru	25 ng/l
Hliník	1 µg/l
Arzén	1 µg/l
Chróm	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Meď	1 µg/l
Železo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikel	1 µg/l
Zinok	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Ortuť	100 ng/l
Striebro	100 ng/l

▼**M8**

Dodatok 3

PODMIENKY TESTU PRI SKÚŠKE LAGDA

1. Testovaný druh	*Xenopus laevis*
2. Typ testu	s nepretržitým prietokom
3. Teplota vody	Nominálna teplota je 21 °C. Priemerná teplota vody počas trvania testu je 21 ±1 °C (rozdiely medzi replikátmi a medzi koncentráciami chemikálie by nemali byť väčšie ako 1,0 °C).
4. Kvalita osvetlenia	Fluorescenčné svietidlá (so širokým spektrom) 600 – 2 000 luxov (lúmenov/m^2) na hladine vody
5. Fotoperióda	12 hodín svetla a 12 hodín tmy
6. Objem testovaného roztoku a testovacia nádoba (nádrž)	4 – 10 l (hĺbka vody najmenej 10 – 15 cm) nádrž zo skla alebo z nehrdzavejúcej ocele
7. Výmeny objemu testovacích roztokov	neustále, s cieľom zachovať biologické podmienky a expozíciu chemikáliám (napr. 5 obnovení objemu za deň)
8. Vek testovaných organizmov na začiatku	Nieuwkoopovo a Faberovo (NF) štádium 8 – 10
9. Počet organizmov na replikát	20 zvierat (embryí)/nádrž (replikát) na začiatku expozície a 10 zvierat (juvenilných jedincov)/ nádrž (replikát) po NF štádiu 66 do skončenia expozície
10. Počet testovaných skupín	najmenej 4 skupiny s aplikovanou testovanou chemikáliou plus príslušné kontroly
11. Počet replikátov na testovanú skupinu	4 replikáty na skupinu s testovanou chemikáliou a 8 replikátov pre kontroly
12. Počet organizmov na testovanú koncentráciu	najmenej 80 zvierat na skupinu s testovanou chemikáliou a najmenej 160 zvierat pre kontroly
13. Voda na riedenie	akákoľvek voda, ktorá umožňuje normálny rast a vývoj druhu *X. laevis* (napr. pramenitá voda alebo voda z vodovodu filtrovaná cez aktívne uhlie)
14. Prevzdušňovanie	Nevyžaduje sa. Prevzdušňovanie nádrží však môže byť potrebné, ak úrovne koncentrácie rozpusteného kyslíka klesnú pod odporúčané limity, pričom sa zvyšuje pri maximalizovaní prietoku testovacieho roztoku.
15. Koncentrácia rozpusteného kyslíka v testovanom roztoku	Koncentrácia rozpusteného kyslíka: ≥ 40 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka alebo ≥ 3,5 mg/l

▼**M8**

16.	pH testovaného roztoku	6,5 – 8,5 (rozdiely medzi replikátmi a medzi koncentráciami chemikálie by nemali byť väčšie ako 0,5)
17.	Tvrdosť a alkalita testovaného roztoku	10 – 250 mg $CaCO_3$/l
18.	Kŕmny režim	(pozri dodatok 4)
19.	Obdobie expozície	od NF štádia 8 – 10 do 10 týždňov po mediáne času do NF štádia 62 v kontrolnej skupine s vodou a/alebo s aplikáciou rozpúšťadla (najviac 17 týždňov)
20.	Biologické sledované parametre	mortalita (a vzhľadové abnormality), čas do NF štádia 62 (vzorka v larválnom štádiu), posúdenie histológie štítnej žľazy (vzorka v larválnom štádiu), rast (hmotnosť a dĺžka), index pomeru hmotnosti pečene k hmotnosti tela (juvenilná vzorka), genetické/fenotypové pomery pohlaví (juvenilná vzorka), histopatológia gonád, reprodukčných trubíc, obličky a pečene (juvenilná vzorka) a vitelogenín v plazme (juvenilná vzorka, voliteľné)
21.	Kritériá platnosti testu	Koncentrácia rozpusteného kyslíka má byť ≥ 40 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka; priemerná teplota vody má byť 21 ±1 °C a rozdiely medzi replikátmi a medzi koncentráciami chemikálie by mali byť < 1,0 °C; pH testovacieho roztoku má byť v rozsahu od 6,5 do 8,5; mortalita v kontrolách má byť ≤ 20 % pri každom replikáte a priemerný čas do NF štádia 62 v kontrole má byť ≤ 45 dní; priemerná hmotnosť testovaných organizmov v NF štádiu 62 a pri ukončení skúšky v kontrolách a kontrolách s aplikáciou rozpúšťadla (ak sa používajú) má dosiahnuť1,0 ±0,2, resp. 11,5 ±3 g; malo by byť preukázateľné, že koncentrácia testovanej chemikálie v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v rozsahu ±20 % stredných nameraných hodnôt.

▼M8

Dodatok 4

KŔMNY REŽIM

Je potrebné poznamenať, že hoci sa odporúča tento kŕmny režim, možné sú aj alternatívy za predpokladu, že testované organizmy vhodným tempom rastú a vyvíjajú sa.

Kŕmenie lariev

Príprava potravy pre larvy

A) štartovacie krmivo pre pstruhy a riasy/krmivo TetraFin® (alebo ekvivalentné krmivo) v objemovom pomere 1:1;

1. štartovacie krmivo pre pstruhy: mixujte 50 g štartovacieho krmiva pre pstruhy (jemné granule alebo prášok) a 300 ml vhodnej filtrovanej vody 20 sekúnd pri vysokých otáčkach mixéra;

2. zmes rias/krmiva TetraFin® (alebo ekvivalentného krmiva): mixujte 12 g diskov z rias spirulina a 500 ml filtrovanej vody 40 sekúnd pri vysokých otáčkach mixéra, zmixujte 12 g krmiva Tetrafin® (alebo ekvivalentného krmiva) s 500 ml filtrovanej vody a potom zmiešajte tieto zmesi, aby ste získali 1 liter zmesi s obsahom 12 g/l rias spirulina a 12 g/l krmiva Tetrafin® (alebo ekvivalentného krmiva),

3. zmiešajte rovnaké objemy zmixovaného štartovacieho krmiva pre pstruhy a zmesi rias/krmiva TetraFin® (alebo ekvivalentného krmiva);

B) Žiabronôžka soľná:

15 ml vajíčok žiabronôžky soľnej sa nechá vyliahnuť v 1 litri slanej vody (pripravenej pridaním 20 ml NaCl do 1 litra deionizovanej vody). Po prevzdušňovaní v trvaní 24 hodín pri izbovej teplote a stálom svetle sa zozbierajú jedince žiabronôžky soľnej. Jedince žiabronôžky soľnej sa nechajú usadiť počas 30 minút tým, že sa zastaví prevzdušňovanie. Cysty, ktoré plávajú navrchu nádoby, sa zlejú a vyradia a jedince žiabronôžky soľnej sa prelejú cez vhodné filtre a zmiešajú sa s filtrovanou vodou, aby sa dosiahol objem 30 ml.

Protokol kŕmenia

V tabuľke 1 sa uvádzajú referenčné informácie týkajúce sa typu a množstva krmiva použitého počas larválnych štádií expozície. Zvieratá sa kŕmia trikrát denne od pondelka do piatka a raz denne počas víkendov.

Tabuľka 1

Kŕmny režim lariev druhu *X. laevis* v prietokových podmienkach

Čas (*) (po oplodnení)	Štartovacie krmivo pre pstruhy: riasy/krmivo TetraFin® (alebo ekvivalentné krmivo)		Žiabronôžka soľná	
	Pracovný deň (trikrát denne)	Víkend (jedenkrát denne)	Pracovný deň (dvakrát denne)	Víkend (jedenkrát denne)
4. – 14. deň (v 0. – 1. týždni)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (od 8. do 15. dňa) 1 ml (od 16. dňa)	0,5 ml (od 8. do 15. dňa) 1 ml (od 16. dňa)
2. týždeň	0,67 ml	2,4 ml		
3. týždeň	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
4. týždeň	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
5. týždeň	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml

▼M8

Čas (*) (po oplodnení)	Štartovacie krmivo pre pstruhy: riasy/krmivo TetraFin® (alebo ekvivalentné krmivo)		Žiabronôžka soľná	
	Pracovný deň (trikrát denne)	Víkend (jedenkrát denne)	Pracovný deň (dvakrát denne)	Víkend (jedenkrát denne)
6. týždeň	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
7. týždeň	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
8. – 10. týždeň	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) 0. deň sa vymedzuje ako deň injekčného podania hCG.

Prechod od stravy pre larvy k strave pre juvenilné jedince

Keď sa pri larvách dokončí metamorfóza, prechádzajú na zloženie potravy pre juvenilné jedince vysvetlené ďalej. V priebehu tohto prechodu sa obmedzuje potrava pre larvy a zvyšuje sa objem krmiva pre juvenilné jedince. Možno to dosiahnuť pomerným znižovaním potravy pre larvy a súčasným pomerným zvyšovaním potravy pre juvenilné jedince, keď každá skupina piatich žubrienok prekročí NF štádium 62 a priblíži sa dokončeniu metamorfózy v NF štádiu 66.

Kŕmenie juvenilných jedincov

Potrava pre juvenilné jedince

Po dokončení metamorfózy (štádium 66) dôjde k zmene kŕmneho režimu, aby obsahoval len prémiové vodné krmivo pre žaby s veľkosťou 3/32 palca (Xenopus Express™, FL, USA) alebo ekvivalentné krmivo.

Príprava drvených peliet na prechod z larválneho do juvenilného štádia

Pelety vodného krmiva pre žaby sa krátko pomelú v mlynčeku na kávu, mixéri alebo sa rozdrvia pomocou trecej misky a paličky, aby sa zmenšila ich veľkosť približne o tretinu. Pri príliš dlhom spracúvaní sa krmivo zmení na prášok, čo sa neodporúča.

Protokol kŕmenia

V tabuľke 2 sa uvádzajú referenčné informácie týkajúce sa typu a množstva krmiva použitého počas vývojových štádií juvenilných a dospelých jedincov. Zvieratá sa kŕmia raz denne. Je potrebné poznamenať, že počas toho, ako pri zvieratách prebieha metamorfóza, aj naďalej čiastočne prijímajú žiabronôžku soľnú v potrave, až kým sa pri > 95 % zvierat neukončí metamorfóza.

V deň ukončenia testu sa zvieratá nemajú kŕmiť, aby nedošlo k zneprehľadneniu meraní hmotnosti v dôsledku prijatej potravy.

Tabuľka 2

Kŕmny režim juvenilných jedincov druhu *X. laevis* v prietokových podmienkach. Je potrebné poznamenať, že zvieratá, pri ktorých neprebehla metamorfóza, vrátane tých, pri ktorých sa metamorfóza oneskorila v dôsledku aplikovania chemikálie, nemôžu konzumovať nerozdrvené pelety

Čas (*) (týždne po mediáne dátumu metamorfózy)	Rozdrvené pelety (mg na malú žabu)	Celé pelety (mg na malú žabu)
Pri dokončení metamorfózy pri zvieratách	25	0
0. – 1. týždeň	25	28

▼**M8**

Čas (*) (týždne po mediáne dátumu metamorfózy)	Rozdrvené pelety (mg na malú žabu)	Celé pelety (mg na malú žabu)
2. – 3. týždeň	0	110
4. – 5. týždeň	0	165
6. – 9. týždeň	0	220

(*) Prvý deň 0. týždňa predstavuje medián dátumu metamorfózy pri kontrolných zvieratách.

▼M8

Dodatok 5

URČENIE GENETICKÉHO POHLAVIA (GENETICKÉ ROZLIŠOVANIE POHLAVIA)

Metóda genetického rozlišovania pohlavia druhu *Xenopus laevis* vychádza z práce Yoshimota a kol., 2008. Podrobné postupy týkajúce sa genotypizácie možno v prípade potreby získať z tejto publikácie. Možno použiť aj alternatívne metódy (napr. vysokovýkonnú metódu qPCR), ak sa považujú za vhodné.

Primery druhu X. laevis

Marker DM-W

Priamy: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Reverzný: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Pozitívna kontrola

Priamy: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Reverzný: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Čistenie DNA

Vykonajte čistenie DNA zo svalového alebo z kožného tkaniva napr. pomocou súpravy Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (kat. č. 69 506) alebo podobného produktu podľa pokynov dodaných so súpravou. DNA možno eluovať z centrifugačných kolón pomocou menšieho objemu tlmivého roztoku, aby sa získali koncentrovanejšie vzorky, ak sa to považuje za potrebné na účely polymerázovej reťazovej reakcie. DNA je pomerne stabilná, preto je potrebné dbať na to, aby sa predišlo krížovej kontaminácii, ktorá by mohla viesť k nesprávnej charakterizácii samcov ako samíc a naopak.

Polymerázová reťazová reakcia

Vzorový protokol s využitím súpravy JumpStart™ *Taq* od spoločnosti Sigma sa uvádza v **tabuľke 1**.

Tabuľka 1

Vzorový protokol s využitím súpravy JumpStart™ *Taq* od spoločnosti Sigma

Hlavná zmes (Master Mix)	1x (µl)	[konečná]
NFW (*)	11	—
Tlmivý roztok 10X	2,0	—
$MgCl_2$ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP (každý 10 mM)	0,4	200 µM
Marker pre primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marker pre rev. primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrola pre primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrola pre rev. primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 jednotky/µl
Matrica DNA	1,0	~200 pg/µl

(*) Voda bez nukleázy.
Poznámka: Pri príprave hlavných zmesí (Master Mix) pripravte určité množstvo naviac, aby bolo možné nahradiť prípadné straty pri pipetovaní (príklad: 25 dávok sa použije na 24 reakcií).

▼**M8**

Reakcia:

Hlavná zmes (Master Mix)	19,0 µl
Matrica	1,0 µl
Spolu	20,0 µl

Profil termocykléra

Krok 1.	94 °C	1 min
Krok 2.	94 °C	30 s
Krok 3.	60 °C	30 s
Krok 4.	72 °C	1 min
Krok 5.	Prechod na krok 2.	35 cyklov
Krok 6.	72 °C	1 min
Krok 7.	4 °C	udržiavať

Produkty PCR možno použiť okamžite v géli alebo ich uskladniť pri teplote 4 °C.

Elektroforéza na agarózovom géli (3 %) (vzorový protokol)

50X TAE

Tris	24,2 g
Ľadová kyselina octová	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Doplňte vodu do 100 ml

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

Agaróza 3:1

3 diely agarózy NuSieve™ GTG™

1 diel agarózy Fisher s nízkou elektroendoosmózou (EEO)

Metóda

1. Pripravte 3 % gél pridaním 1,2 g zmesi agarózy k 43 ml 1X TAE. Krúživým pohybom premiešajte, aby sa rozpadli veľké zhluky.

2. Zahrievajte zmes agarózy, až kým sa úplne nerozpustí (zabráňte tomu, aby zovrela). Nechajte mierne vychladnúť.

3. Pridajte 1,0 µL etídiumbromidu (10 mg/ml). Krúživým pohybom premiešajte obsah banky. Etídiumbromid je mutagénny, preto sa majú v tomto kroku používať alternatívne chemikálie, pokiaľ je to technicky možné, aby sa minimalizovali riziká pre zdravie pracovníkov ([1]).

4. Nalejte gél do foriem s hrebeňom. Nechajte úplne vychladnúť.

([1]) V súlade s článkom 4.1 smernice Európskeho parlamentu a Rady 2004/37/ES z 29. apríla 2004 o ochrane pracovníkov pred rizikami z vystavenia účinkom karcinogénov alebo mutagénov pri práci (šiesta samostatná smernica v zmysle článku 16 ods. 1 smernice Rady 89/391/EHS) (Ú. v. EÚ L 158, 30.4.2004, s. 50).

▼**M8**

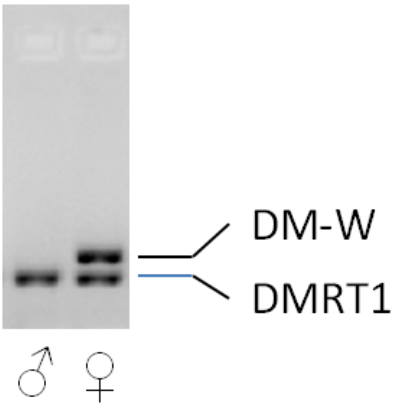
5. Pridajte gél do prístroja. Pokryte gél pomocou 1X TAE.

6. Pridajte 1 µl 6x nanášacieho farbiva na každých 10 µl produktu PCR.

7. Pomocou pipety rozdeľte vzorky do jamiek.

8. Spracúvajte pri konštantnom napätí 160 voltov približne 20 minút.

Na **obrázku 1** je zobrazený agarózový gél s pruhovými vzormi, ktoré označujú samčie a samičie jedince.



Obrázok 1: Obrázok agarózového gélu s pruhovým vzorom, ktorý označuje samčieho (♂) jedinca (jeden pruh ~203 bp: DMRT1) a samičieho (♀) jedinca (dva pruhy ~259 bp: DM-W a 203 bp: DMRT1).

LITERATÚRA

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

Dodatok 6

MERANIE VITELOGENÍNU

Na meranie vitelogenínu (VTG) sa používa enzýmové imunosorbentové stanovenie (ELISA), ktoré bolo pôvodne vyvinuté na účely stanovenia VTG v prípade čereble potočnej (Parks a kol., 1999). V súčasnosti neexistujú komerčne dostupné protilátky pre druh *X. laevis*. Vzhľadom na dostatok informácií o tomto proteíne a dostupnosť nákladovo efektívnych komerčných služieb na produkciu protilátok však možno primerane predpokladať, že v laboratóriách možno jednoducho použiť metódu ELISA na uskutočnenie tohto merania (Olmstead a kol., 2009). V zdroji Olmstead a kol. (2009) sa opisuje aj úprava tejto skúšky na meranie VTG pri druhu *X. tropicalis*, ktorá sa uvádza ďalej. V tejto metóde sa používa protilátka vytvorená proti VTG druhu *X. tropicalis*, je však známe, že účinkuje aj proti VTG druhu *X. laevis*. Je potrebné poznamenať, že možno používať aj nekompetitívne metódy ELISA a že tieto metódy môžu mať nižší detekčný limit než metóda opísaná ďalej.

Materiály a činidlá

— vopred adsorbované sérum s prvou protilátkou (Ab),

— Zmiešajte 1 diel séra s prvou protilátkou proti VTG druhu *X. tropicalis* s 2 dielmi kontrolnej samčej plazmy a nechajte približne 75 minút pri izbovej teplote, položte na ľad na 30 minút, odstreďujte 1 hodinu pri > 20 000 g pri teplote 4 °C, odstráňte supernatant, rozdeľte na alikvoty a uskladnite pri teplote –20 °C.

— druhá protilátka,

— kozí anti-králičí IgG-HRP konjugát (napr. Bio-Rad 172-1019),

— štandard VTG,

— čistený VTG druhu *X. laevis* s koncentráciou 3,3 mg/ml,

— TMB (3,3',5,5‘-tetrametylbenzidín) (napr. KPL 50-76-00 alebo Sigma T0440),

— normálne kozie sérum (NGS)(napr. Chemicon® S26 – 100 ml),

— 96-jamkové polystyrénové mikrotitračné platničky EIA (napr. ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)

— hybridizačná pec s teplotou 37 °C (alebo inkubátor s rýchlym dosahovaním rovnováhy vzduchu) pre mikrotitračné platničky, vodný kúpeľ pre skúmavky,

— ďalšie bežné laboratórne vybavenie, chemikálie a spotrebný materiál.

Postupy

Krycí tlmivý roztok (50 mM uhličitanový tlmivý roztok, pH 9,6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
voda	428 ml

10X PBS (0,1 M fosfát, 1,5 M NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
voda	810 ml

▼**M8**

Premývací tlmivý roztok (PBST):

10X PBS	100 ml
voda	900 ml

Upravte pH na 7,3 pomocou 1 M HCl, potom pridajte 0,5 ml Tween-20

Tlmivý skúšobný roztok:

normálne kozie sérum (NGS)	3,75 ml
premývací tlmivý roztok	146,25 ml

Odber vzoriek

Krv sa odoberie pomocou heparinizovanej mikrohematokritovej kapiláry a umiestni sa na ľad. Po centrifugácii v trvaní 3 minúty sa kapilára posúdi, rozlomením sa otvorí a plazma sa premiestni do skúmaviek mikroodstredivky s objemom 0,6 ml, ktoré obsahujú 0,13 jednotky lyofilizovaného aprotinínu. (Tieto skúmavky sa pripravia vopred pridaním vhodného objemu aprotinínu, zmrazením a lyofilizovaním v zariadení speed-vac s nízkou úrovňou tepla až do vysušenia.) Plazmu uskladnite pri teplote –80 °C až do analyzovania.

Postup pre jednu mikrotitračnú platničku

Vytvorenie krycej vrstvy na mikrotitračnej platničke

Zmiešajte 20 µl čisteného VTG s 22 ml uhličitanového tlmivého roztoku (konečná koncentrácia 3 µg/ml). Pridajte 200 µl do jednotlivých jamiek 96-jamkovej mikrotitračnej platničky. Zakryte mikrotitračnú platničku pomocou priľnavej tesniacej fólie a nechajte ju inkubovať dve hodiny pri teplote 37 °C (alebo cez noc pri teplote 4 °C).

Blokovanie mikrotitračnej platničky

Blokujúci roztok sa pripraví pridaním 2 ml normálneho kozieho séra (NGS) do 38 ml uhličitanového tlmivého roztoku. Odstráňte krycí roztok a osušte pretrepávaním. Do každej jamky pridajte 350 µl blokujúceho roztoku. Zakryte pomocou priľnavej tesniacej fólie a inkubujte dve hodiny pri teplote 37 °C (alebo cez noc pri teplote 4 °C).

Príprava štandardov

5,8 µl čisteného VTG štandardu sa zmieša s 1,5 ml tlmivého skúšobného roztoku v jednorazovej borosilikátovej sklenenej skúmavke s rozmermi 12 ×75 mm. Dosiahne sa tak koncentrácia 12 760 ng/ml. Potom sa uskutoční sériové riedenie pridaním 750 µl predchádzajúceho riedenia k 750 µl tlmivého skúšobného roztoku, aby sa dosiahli konečné koncentrácie 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 a 50 ng/ml.

Príprava vzoriek

Začnite riedením plazmy do tlmivého skúšobného roztoku v pomere 1:300 (napr. zmiešaním 1 µl plazmy s 299 µl tlmivého skúšobného roztoku) alebo v pomere 1:30. Ak sa očakáva veľké množstvo VTG, môžu byť potrebné ďalšie alebo väčšie riedenia. Usilujte sa udržiavať hodnotu B/B_o v rozsahu štandardov. V prípade vzoriek bez značného obsahu VTG, napr. v prípade kontrolných samcov a samíc (ktoré sú všetky nezrelé), použite riedenie v pomere 1:30. Pri vzorkách s menším než uvedeným riedením sa môžu prejavovať nežiaduce matricové efekty.

Navyše sa odporúča na každej mikrotitračnej platničke testovať aj pozitívnu kontrolnú vzorku. Táto vzorka pochádza zo zásoby plazmy, ktorá obsahuje vysoké indukované úrovne VTG. Táto zásoba sa najskôr zriedi v NGS, rozdelí sa na alikvoty a uskladní sa pri teplote –80 °C. Pre každú mikrotitračnú platničku sa alikvot rozmrazí, ďalej sa zriedi v tlmivom skúšobnom roztoku a testuje sa podobne ako testovacia vzorka.

▼**M8**

Inkubácia s prvou protilátkou

Prvá protilátka sa pripraví zriedením vopred adsorbovaného séra s prvou protilátkou v tlmivom skúšobnom roztoku v pomere 1:2000 (napr. 8 µl na 16 ml tlmivého skúšobného roztoku). V sklenenej skúmavke zmiešajte 300 µl roztoku prvej protilátky s 300 µl vzorky/štandardu. Podobne sa pripraví skúmavka B_o, ktorá obsahuje 300 µl tlmivého skúšobného roztoku a 300 µl protilátky. Pripraví sa aj skúmavka NSB, ktorá obsahuje len 600 µl tlmivého skúšobného roztoku, t. j. žiadne protilátky. Uzatvorte skúmavky a opatrne ich zmiešajte pretrepaním. Inkubujte 1 hodinu vo vodnom kúpeli s teplotou 37 °C.

Premytie mikrotitračnej platničky

Bezprostredne pred dokončením inkubácie prvej protilátky vykonajte premytie mikrotitračnej platničky. Dosiahnete to pretrepaním obsahu a vysušením dotykom savého papiera. Potom naplňte jamky 350 µl premývacieho roztoku, zlejte ho a platničku osušte. Pri tomto postupe je užitočná viackanálová opakovacia pipeta alebo premývač mikrotitračnej platničky. Krok premytia sa zopakuje ešte dvakrát, aby sa spolu uskutočnili tri premytia.

Naplnenie mikrotitračnej platničky

Po premytí mikrotitračnej platničky vyberte skúmavky z vodného kúpeľa a zľahka ich pretrepte. Do zdvojených jamiek na mikrotitračnej platničke pridajte 200 µl z každej skúmavky vzorky, štandardu, B_o a NSB. Zakryte mikrotitračnú platničku pomocou priľnavej tesniacej fólie a nechajte ju inkubovať 1 hodinu pri teplote 37 °C.

Inkubácia s druhou protilátkou

Na konci inkubácie v predchádzajúcom kroku je potrebné mikrotitračnú platničku znovu trikrát premyť, ako bolo opísané vyššie. Zriedená druhá protilátka sa pripraví zmiešaním 2,5 µl druhej protilátky s 50 ml tlmivého skúšobného roztoku. Pridajte 200 µl zriedenej druhej protilátky do každej jamky, uzatvorte podľa predchádzajúceho opisu a inkubujte 1 hodinu pri teplote 37 °C.

Pridanie substrátu

Po dokončení inkubácie s druhou protilátkou trikrát premyte mikrotitračnú platničku podľa predchádzajúceho opisu. Potom do každej jamky pridajte 100 µl substrátu TMB. Nechajte reakciu prebiehať 10 minút, podľa možnosti mimo ostrého svetla. Zastavte reakciu pridaním 100 µl 1 M kyseliny fosforečnej. Spôsobí to zmenu farby z modrej na intenzívnu žltú. Pomocou snímača mikrotitračných platničiek zmerajte absorbanciu pri 450 nm.

Výpočet B/Bo

Od všetkých meraní odpočítajte priemernú hodnotu NSB. B/B_o pre každú vzorku a štandard sa vypočíta ako podiel hodnoty absorbancie (B) a priemernej absorbancie vzorky B_o.

Získanie krivky štandardov a určenie neznámych množstiev

Vytvorte krivku štandardov pomocou počítačového softvéru na tvorbu grafov (napr. Slidewrite™ alebo Sigma Plot®), ktorým sa extrapoluje množstvo z hodnoty B/B_o vzorky na základe hodnoty B/B_o štandardov. Toto množstvo sa zvyčajne znázorní v logaritmickej mierke a krivka bude mať sigmoidálny tvar. Pri použití úzkeho rozsahu štandardov však môže vyzerať lineárna. Vykonajte korekciu množstiev vzorky na základe faktora riedenia a uveďte ich v mg VTG/ml plazmy.

Stanovenie minimálnych detekčných limitov (MDL)

Najmä pri normálnych samcoch často nebude zrejmé, akým spôsobom prezentovať výsledky pri nízkych hodnotách. V takých prípadoch je potrebné pomocou 95 % hraníc spoľahlivosti potrebné určiť, či sa má hodnota uviesť ako nula alebo ako iné číslo. Ak sa výsledok vzorky nachádza v rámci intervalu spoľahlivosti nulového štandardu (B_o), výsledok sa uvádza ako nula. Minimálna úroveň

▼**M8**

detekcie bude predstavovať najnižší štandard, ktorý sa stabilne odlišuje od nulového štandardu, čo znamená, že sa tieto dva intervaly spoľahlivosti neprekrývajú. Pri každom výsledku vzorky, ktorý je v rámci hranice spoľahlivosti minimálnej úrovne detekcie alebo nad ňou, sa uvádza vypočítaná hodnota. Ak vzorka spadá medzi intervaly spoľahlivosti nulového štandardu a minimálnej úrovne detekcie, jedna polovica minimálnej úrovne detekcie sa má uvádzať ako hodnota tejto vzorky.

LITERATÚRA

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

Dodatok 7

ŠTATISTICKÁ ANALÝZA

V rámci skúšky LAGDA sa vytvárajú tri druhy údajov, ktoré sa majú štatisticky analyzovať: 1. kvantitatívne spojité údaje; 2. údaje vyjadrujúce čas do udalosti pri tempe vývoja (čas do NF štádia 62) a 3. poradové údaje v podobe skóre závažnosti alebo vývojových štádií z histopatologických hodnotení. Odporúčaná schéma rozhodovania z hľadiska štatistickej analýzy pre skúšku LAGDA sa uvádza na obrázku 1. Ďalej sú uvedené aj niektoré poznámky, ktoré môže byť potrebné zohľadniť pri vykonávaní štatistickej analýzy meraní zo skúšky LAGDA. Podľa schémy rozhodovania z hľadiska analýzy sa výsledky meraní mortality, rastu (hmotnosť a dĺžka) a indexu pomeru hmotnosti pečene k hmotnosti tela (LSI) analyzujú na základe vetvy „Iné sledované parametre“.

Spojité údaje

V prípade údajov pre spojité sledované parametre je potrebné najskôr overiť ich monotónnosť pomocou transformácie údajov podľa poradia, dosadením do modelu ANOVA a porovnaním lineárnych a kvadratických kontrastov. Ak sú údaje monotónne, uskutoční sa Jonckheerov-Terpstrov test trendu na mediánoch replikátov a nepoužijú sa žiadne ďalšie analýzy. Alternatívu pre údaje s normálnym rozdelením a homogénnymi rozptylmi predstavuje step-down Williamsov test. Ak údaje nie sú monotónne (kvadratický kontrast je významný a lineárny kontrast nie je významný), majú sa analyzovať pomocou modelu ANOVA so zmiešanými účinkami. Ďalej sa pri údajoch posudzuje normalita (podľa možnosti pomocou Shapirovho-Wilkovho alebo Andersonovho-Darlingovho testu) a homogenita rozptylu (podľa možnosti pomocou Levenovho testu). Oba testy sa uskutočňujú na rezíduách modelu ANOVA so zmiešanými účinkami. Namiesto týchto formálnych testov normality a homogenity rozptylu možno použiť odborný posudok, ale uprednostňujú sa formálne testy. Ak majú údaje normálne rozdelenie s homogénnymi rozptylmi, sú splnené predpoklady analýzy ANOVA so zmiešanými účinkami a významný účinok testovanej chemikálie sa stanoví na základe Dunnettovho testu. Ak sa zistí nenormalita alebo heterogenita rozptylu, predpoklady Dunnettovho testu nie sú splnené a je potrebné vykonať normalizačnú transformáciu na stabilizáciu rozptylu. Ak sa takáto transformácia nenájde, významný účinok testovanej chemikálie sa stanoví na základe Dunnovho testu. Ak je to možné, má sa použiť jednostranný test namiesto dvojstranného testu. Pri stanovení toho, ktorý test je vhodný pre daný sledovaný parameter, sa však vyžaduje odborné posúdenie.

Mortalita

Údaje o mortalite sa analyzujú za časové obdobie zahŕňajúce celý test a vyjadrujú sa ako podiel uhynutých jedincov v príslušnej nádrži. Žubrienky, pri ktorých sa v danom časovom rámci nedokončila metamorfóza, žubrienky, ktoré sú v kohorte podvzorky jedincov v larválnom štádiu, juvenilné žaby vyradené v rámci selekcie a všetky zvieratá, ktoré uhynú v dôsledku chyby pri pokuse, sa považujú za cenzurované údaje a nie sú zahrnuté v menovateli pri výpočte percentuálnej hodnoty. Pred štatistickými analýzami sa má pri podieloch mortality uskutočniť arkussínusová transformácia druhej odmocniny. Alternatívne možno použiť step-down Cochranov-Armitageov test, prípadne s Raovou-Scottovou úpravou pri výskyte nadmerného rozptylu.

Hmotnosť a dĺžka (údaje o raste)

Samce a samice nie sú počas metamorfózy pohlavne dimorfné, preto sa údaje o raste podvzorky jedincov v larválnom štádiu majú analyzovať nezávisle od pohlavia. Údaje o raste juvenilných jedincov sa však analyzujú samostatne na základe genetického pohlavia. V prípade týchto sledovaných parametrov môže byť potrebná logaritmická transformácia, keďže logaritmická normalita údajov o veľkosti nie je nezvyčajná.

▼M8

Index pomeru hmotnosti pečene k hmotnosti tela (LSI)

Hmotnosti pečene sa normalizujú ako podiel celkovej hmotnosti tela (t. j. LSI) a analyzujú sa oddelene na základe genetického pohlavia.

Čas do NF štádia 62

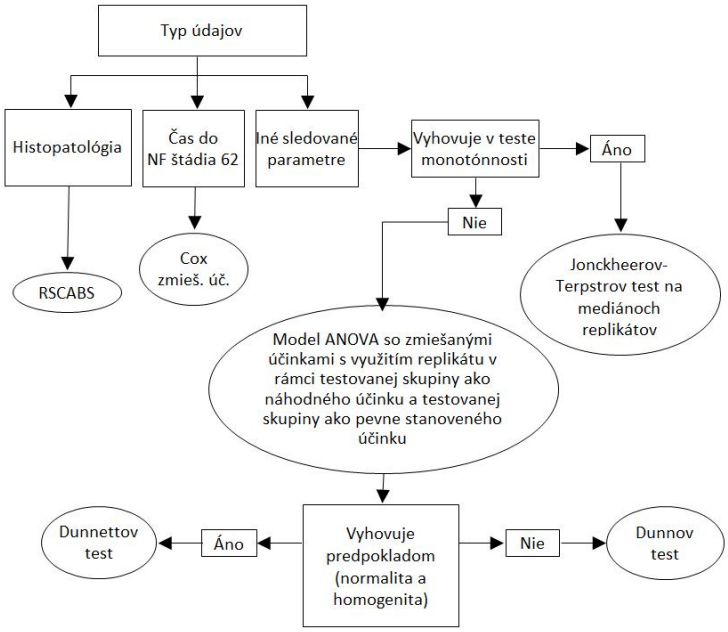
Údaje o čase do metamorfózy sa spracúvajú ako údaje o čase do udalosti, pričom úhyny alebo jedince, ktoré nedosiahli NF štádium 62 do 70 dní, sa považujú za cenzurované údaje po časovom limite (t. j. skutočná hodnota je väčšia ako 70 dní, ale štúdia sa končí pred tým, ako zvieratá dosiahnu NF štádium 62 do 70 dní). Na stanovenie času ukončenia testu sa má použiť medián času do dokončenia metamorfózy v NF štádiu 62 v kontrolách s vodou na riedenie. Medián času do dokončenia metamorfózy možno stanoviť pomocou Kaplanových-Meierových odhadov limitu súčinu. Tento sledovaný parameter sa analyzuje pomocou Coxovho modelu proporcionálnych rizík so zmiešanými účinkami, v ktorom sa zohľadňuje štruktúra štúdie s využitím replikátov.

Údaje týkajúce sa histopatológie (skóre závažnosti a vývojové štádiá)

Údaje týkajúce sa histopatológie sú v podobe skóre závažnosti alebo vývojových štádií. V teste s označením RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) sa využíva step-down Cochranov-Armitageov test trendu s Raovou-Scottovou úpravou na jednotlivých úrovniach závažnosti histopatologickej reakcie (Green a kol., 2014). Pomocou Raovej-Scottovej úpravy sa do testu začleňuje koncepcia pokusu s využitím nádob s replikátmi. V postupe označenom ako „by Slices“ je začlenené biologické očakávanie, že závažnosť účinku má tendenciu zvyšovať sa so zvyšujúcimi sa dávkami alebo koncentráciami, pričom sa zachovávajú skóre jednotlivých jedincov a preukazuje sa závažnosť každého zisteného účinku. Postupom RSCABS sa určuje nielen to, ktoré testované skupiny sa štatisticky odlišujú od kontrol (t. j. sú v nich závažnejšie patologické javy než pri kontrolách), ale aj to, pri akom skóre závažnosti k danému rozdielu dochádza, čím sa získava veľmi potrebný kontext pre analýzu. V prípade určovania vývojového štádia gonád a reprodukčných trubíc sa má pri údajoch použiť dodatočná manipulácia vzhľadom na predpoklad metódy RSCABS, že závažnosť účinku sa zvyšuje s dávkou. Pozorovaný účinok môže predstavovať oneskorenie alebo zrýchlenie vývoja. Údaje o určení vývojového štádia sa preto analyzujú tak, ako sú uvádzané, na zistenie zrýchlenia vývoja a potom sa manuálne invertujú pred druhou analýzou s cieľom zistiť oneskorenie vývoja.

Obrázok 1

Schéma rozhodovania z hľadiska štatistickej analýzy pre údaje skúšky LAGDA



▼**M8**

LITERATÚRA

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1108 – 1 116.

▼M8

Dodatok 8

ÚVAHY TÝKAJÚCE SA SLEDOVANIA A MINIMALIZOVANIA VÝSKYTU SKOLIÓZY

Idiopatická skolióza, ktorej zvyčajným prejavom pri žubrienkach druhu *Xenopus laevis* je ohnutý chvost, môže komplikovať pozorovania morfológie a správania v testovaných populáciách. Je potrebné vyvinúť úsilie, aby sa minimalizoval alebo eliminoval výskyt skoliózy v chovnej populácii aj v testovacích podmienkach. V konečnom teste sa odporúča, aby bola prevalencia miernej a závažnej skoliózy nižšia ako 10 %, čím sa zlepší spoľahlivosť testu pri detekcii vývojových účinkov súvisiacich s testovanou chemikáliou v prípade inak zdravých lariev obojživelníkov.

Pri denných pozorovaniach počas konečného testu sa zaznamenáva výskyt (počet jednotlivých prípadov) a závažnosť skoliózy v prípade jej výskytu. Povahu abnormality je potrebné opísať vzhľadom na miesto (napr. pred alebo za kloakou) a smer zakrivenia (napríklad laterálne alebo dorzoventrálne). Závažnosť možno hodnotiť týmito stupňami:

(NR) Nepozorovaná: zakrivenie nie je prítomné

1. Minimálna: mierne laterálne zakrivenie za kloakou, viditeľné len v pokoji

2. Mierna: laterálne zakrivenie za kloakou, viditeľné neustále, ktoré však nebráni v pohybe

3. Závažná: laterálne zakrivenie pred kloakou ALEBO akékoľvek zakrivenie, ktoré bráni v pohybe, ALEBO akékoľvek dorzoventrálne zakrivenie

Vedecká poradná skupina Agentúry Spojených štátov na ochranu životného prostredia (FIFRA SAP 2013) preskúmala súhrnné údaje o skolióze v 15 skúškach metamorfózy obojživelníkov v prípade druhu *X. laevis* (NF štádium 51 až 60 a viac) a poskytla všeobecné odporúčania na zníženie prevalencie tejto abnormality v testovacích populáciách. Tieto odporúčania sú relevantné pre test LAGDA, hoci zahŕňa dlhší časový rámec vývoja.

Historická výkonnosť pri rozmnožovaní

Ako chovné páry sa majú vo všeobecnosti používať kvalitné a zdravé dospelé jedince. Eliminovaním chovných párov, ktorých potomstvo malo skoliózu, sa môže v priebehu času minimalizovať jej výskyt. Prospešné môže byť obzvlášť minimalizovanie využívania chovných populácií získaných vo voľnej prírode. Obdobie expozície v skúške LAGDA sa začína s embryami v NF štádiu 8 až 10 a na začiatku testu nie je možné určiť, či sa pri daných jedincoch vyskytne skolióza. Okrem sledovania výskytu skoliózy pri zvieratách zaradených do testu je potrebné zdokumentovať aj historickú výkonnosť násady (vrátane prevalencie skoliózy pri larvách, ktorým sa umožní, aby sa vyvíjali). Môže byť užitočné ďalej monitorovať tú časť násady, ktorá sa v danej štúdii nepoužije, a uviesť tieto pozorovania (FIFRA SAP 2013).

Kvalita vody

Je dôležité zabezpečiť primeranú kvalitu vody v laboratórnej chovnej populácii aj počas testu. Okrem kritérií kvality vody, ktoré sa bežne hodnotia v testoch vodnej toxicity, môže byť užitočné monitorovať a korigovať nedostatok živín (napr. nedostatok vitamínu C, vápnika, fosforu) alebo nadmerné úrovne selénu a medi, ktoré sa uvádzajú ako príčina vzniku rôznych stupňov skoliózy pri laboratórne chovaných zvieratách rodu *Rana* a *Xenopus* (Marshall a kol. 1980; Leibovitz a kol. 1992; Martinez a kol. 1992; ako uvádza FIFRA SAP 2013). Použitím vhodného režimu kŕmenia (pozri dodatok 4) a pravidelným čistením nádrží sa vo všeobecnosti zlepší kvalita vody a zdravie jedincov, ktoré predstavujú testovacie vzorky.

▼M8

Potrava

V dodatku 4 sú podrobne opísané konkrétne odporúčania pre režim kŕmenia, ktorý sa osvedčil v skúške LAGDA. Odporúča sa, aby sa overovalo, či zdroje krmiva neobsahujú biologické toxíny, herbicídy a iné pesticídy, o ktorých je známe, že spôsobujú skoliózu pri druhu *X. laevis* alebo pri iných vodných živočíchoch (Schlenk a Jenkins 2013). Napríklad, expozícia určitým inhibítorom butyrylcholínesterázy sa spája so skoliózou pri rybách (Schultz a kol. 1985) a pri žabách (Bacchetta a kol. 2008).

LITERATÚRA

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.